

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovateli povinen řádně ocitovat.

Univerzita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra genetiky a mikrobiologie



Periferní cirkadiánní hodiny savců, jejich  
molekulární mechanismus a synchronizace

Mammalian circadian clock in peripheral  
organs, molecular mechanism and  
entrainment

Lenka Polidarová

V Praze 2008

vedoucí práce  
PharmDr. Alena Sumová, DrSc.

Prohlašuji, že jsem předkládanou diplomovou práci vypracovala samostatně, pouze s použitím literárních pramenů uvedených v seznamu literatury a pod odborným vedením PharmDr. Aleny Sumové, DrSc.

Lenka Polidarová

# PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat mojí školitelce PharmDr. Aleně Sumové, DrSc. za její odborné vedení při sepisování této práce. Děkuji také všem kolegům z laboratoře neurohumorálních regulací za jejich pomoc a cenné rady. Děkuji rodině a přátelům za jejich podporu. Velký dík patří mojí kamarádce Tereze za přečtení primární verze tohoto textu.

Diplomová práce byla vypracována v letech 2006-2008 v rámci grantových projektů: GAAV ČR č. 500110605: Molekulární mechanismy cirkadiánních hodin v buňkách střevního epitelu laboratorního potkana.

GA ČR č. 309/08/0503: Synchronizace cirkadiánního systému laboratorního potkana.

# **Mammalian circadian clock in peripheral organs, molecular mechanism and entrainment**

The circadian system controls timing of behavioral and physiological processes in most organisms. In mammals, central oscillator is located in the suprachiasmatic nuclei (SCN) of the anterior hypothalamus. Apart from the SCN, peripheral oscillators are located in numerous organs like liver, heart, lung, muscle, intestine etc. The central and peripheral oscillators need to be synchronized by external cues (Zeitgeber). The SCN coordinates and entrains the phase of the clocks in numerous peripheral tissues via neuronal and humoral signals. For the SCN, dominant synchronizer is external light-dark cycle. Peripheral oscillators are cell-autonomous, they could work also independently of the SCN as a consequence of a feeding cycle. The basic molecular core clock mechanism responsible for generating circadian rhythms in the central and peripheral clocks is composed of transcriptional/translational feedback loops between the clock genes and their protein products.

The aim of the present thesis was to ascertain whether the clock gene and protein expressions exhibit circadian rhythms in the rat intestine and whether the core clock mechanism drives expression of a cell cycle regulator *rWee1*. Next aim was to reveal how the circadian rhythms in expression of clock genes develop in the rat colon during prenatal and early postnatal ontogenesis.

Daily expression profiles of clock genes *rPer1*, *rPer2*, *rBmal1*, *rRev-erb- $\alpha$* , *rClock*, *rCry1* and clock-controlled gene *rWee1* were examined by quantitative PCR within different parts of epithelium of the rat intestine, namely of the duodenum, jejunum, ileum, colon. *rPer1*, *rPer2*, *rBmal1*, *rRev-erb- $\alpha$*  and *rWee1* genes were expressed rhythmically in all studied parts of the gut. The rhythms in gene expression exhibited differences in their phases, such that the rhythm in duodenum was phase-advanced to the colon. rPER1 and rBMAL1 proteins were localized in the colonic epithelium by immunocytochemistry. Colonic clock developed gradually during ontogenesis. The phase of the developing rhythms shifted during postnatal period likely due to changes in the feeding habits.

Understanding the molecular mechanism of the circadian clock within the intestine may facilitate treatment of diseases caused by malfunctions of the circadian system, like colorectal cancer.

Key words: Circadian rhythms, clock genes, suprachiasmatic nuclei, peripheral organs, entrainment, ontogenesis, quantitative PCR, immunocytochemistry

Klíčová slova: Cirkadiánní rytmy, hodinové geny, suprachiasmatická jádra, periferní orgány, synchronizace, ontogeneze, kvantitativní PCR, imunocytochemie

# SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Ara-C	-cytozin $\beta$ -D arabinofuranosid
AVP	-arginin vasopresin (z angl. arginin vassopresine)
B2M	- $\beta$ -2-mikroglobulin
bHLH	-DNA vazebná doména basic helix-loop-helix
bZIP	-DNA vazebná doména leucinový zip
cAMP	-cyklický adenosinmonofosfát
CBP/300	-z angl. CREB binding protein
CCGs	-hodinami kontrolované geny (z angl. clock controlled genes)
CDC	-cyklin dependentní kináza (z angl. cyclin-dependent kinase)
cDNA	-komplementární DNA
cGMP	-cyklický guanozinmonofosfát
CKI $\delta$	-kasein kináza I delta (z angl. casein kinase I delta)
CKI $\epsilon$	-kasein kináza I epsilon (z angl. casein kinase I epsilon)
CLD	-cytoplazmatická lokalizační doména (z angl. cytoplasmatic localization domain)
CRE	-z angl. cAMP response element
CREB	-z angl. cAMP response element binding protein
<i>Cry</i>	- <i>Cryptochrome</i> gen
CT	-cirkadiánní čas (z angl. circadian time)
DAB	-diaminobenzidin
DBP	-albumin D-element vázající protein (z angl. albumin D-element binding protein)
<i>Dbt</i>	- <i>Doubletime</i> gen
DD	-světelný režim stálá tma (z angl. dark-dark)
ddH <sub>2</sub> O	-redestilovaná voda
DEPC	-diethylpyrokarbonát
Dex	-dexametazon
dH <sub>2</sub> O	-destilovaná voda
Dm	-dorzomediální
DMH	-dorzomediální jádro hypotalamu (z angl. dorzomedial hypothalamic nucleus)

dNTP	-deoxynukleotidtrifosfát
ENK	-enkefalin
FASPS	-dědičný syndrom posunutí spánku (z angl. familial advanced sleep phase syndrom)
FEO	-příjem potravy synchronizovatelný oscilátor ( z angl. food-entrainable oscillator
<i>Frq</i>	- <i>Frequency</i> gen
5-FU	-5-fluorouracil
GABA	-kyselina $\gamma$ -aminomáselná
GC	-guanylát cykláza
GHT	-genikulohypotalamický trakt
GIT	-gastrointestinální trakt
GRE	-z angl. non-glucocorticoid responsive element
GRP	-gastrin uvolňující peptid (z angl. gastrin releasing peptide)
GSK3 $\beta$	-z angl. glycogen synthase kinase 3 $\beta$
HAT	-histonacetyláza
HDAC	-histondeacetyláza
HLF	-z angl. hepatic leukocyte factor
HPA	-hypotalamo-hypofyzární nadledvinková dráha (z angl. hypothalamo-pituitary-adrenal axis)
IEG	-okamžitý časný gen (z angl. immediate early gene)
IGL	-intergenikulární listek talamu
IP	-inkubační pufr
kDa	-kilodalton
kpb	-kilopárů bází
LD	-světelný režim světlo-tma (z angl. light-dark)
LL	-světelný režim stálé světlo (z angl. light-light)
MAP kináza	-mitogeny aktivovaná protein kináza (z angl. mitogen activated protein kinase)
NAD(P) <sup>+</sup>	-oxidovaná forma nikotinamid adenin dinukleotidů
NAD(P)H	-redukována forma nikotinamid adenin dinukleotidů
NAT	-N-acetyltransferáza
NES	-jaderný exportní signál
NGS	-normální koží sérum



NLS	-jaderný lokalizační signál
NMDA	-N-metyl-D-aspartát
NO	-oxid dusnatý
NPAS2	-z angl. neuronal PAS domain protein 2
NPY	-neuropeptid Y
PACAP	-hypofyzární adenylát cyklázu aktivující protein (z angl. pituitary adenylate cyclase-activating peptide)
PAS	-akronym názvů tří proteinů PER, ARNT, SIM
PBS	-fyziologický roztok pufrovaný fosfáty
PCR	-z angl. polymerase chain reaction
<i>Per</i>	- <i>Period</i> gen
PER2::LUC	-PERIOD2::LUCIFERÁZA
PFA	-paraformaldehyd
PKC	-protein kináza C
PKG	-protein kináza G
PP	-promývací pufr
PRC	-fázově responzní křivka (z angl. phase response curve)
PVN	-paraventrikulární jádro hypotalamu (z angl. paraventricular nucleus of the hypothalamus)
RAR	-receptory pro kyselinu retinovou
RevRE	-z angl. Rev-erb response element
RF	-z angl. restricted feeding
RHT	-retinohypotalamický trakt
rpm	-počet otáček za minutu
RORE	-z angl. Rev/ROR response element
ROR/RZR	-z angl. retinoic acid related orphan receptors
RT	-reverzní transkriptáza
RTKs	-tyrozin kinázové receptory (z angl. receptor-tyrosine kinases)
SCN	-suprachiasmatická jádra (z angl. suprachiasmatic nucleus)
SP	-substance P
$\tau$ (tau)	-vnitřní perioda oscilátoru
TEF	-z angl. thyrotropic embryonic factor
<i>Tim</i>	- <i>Timeless</i> gen
TR	-receptory pro thyroidní hormony

VIP	-vasointestinální peptid (z angl. vasoactive intestinal polypeptide)
VI	-ventrolaterální

# OBSAH

1. ÚVOD .....	12
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED .....	14
2.1. Biologické rytmy .....	14
2.2. Cirkadiánní systém.....	16
2.2.1. Suprachiasmatická jádra (SCN).....	16
2.2.2. Vstupní a výstupní dráhy centrálního oscilátoru.....	17
2.3. Molekulární mechanismus cirkadiánních oscilací .....	20
2.3.1. Strukturní motivy hodinových genů .....	20
2.3.2. Obecné schéma .....	21
2.3.3. Hodinové geny.....	24
2.3.4. Hodinami kontrolované geny (CCGs) .....	32
2.4. Periferní orgány .....	35
2.4.1. Synchronizace periferních orgánů změnou světelných podmínek .....	37
2.4.2. Synchronizace periferních orgánů příjmem potravy.....	38
2.4.3. Cirkadiánní hodiny v gastrointestinálním traktu.....	42
2.4.4. Kontrola cyklu buněčného dělení v gastrointestinálním traktu.....	42
2.5. Cirkadiánní systém během ontogeneze .....	44
3. MATERIÁL A METODIKA .....	47
3.1. Chov experimentálních zvířat .....	47
3.2. Uspořádání jednotlivých pokusů.....	47
3.2.1. Detekce exprese hodinových genů a genu <i>rWeel</i> v jednotlivých částech trávicího systému (dvanáctník, lačník, kyčelník, tlusté střevo) potkana během 12 hodin a 24 hodin.....	47
3.2.2. Detekce proteinů rBMAL1 a rPER1 v kolorektální části tlustého střeva potkana během 24 hodin .....	48
3.2.3. Detekce vývoje rytmické exprese hodinových genů v tlustém střevu potkana během ontogeneze .....	48
3.3. Detekce mRNA hodinových genů a genu <i>rWeel</i> pomocí kvantitativní real-time RT-PCR.....	49
3.3.1. Postup .....	52
3.3.1.1. Izolace celkové RNA .....	52
3.3.1.2. Syntéza cDNA .....	53
3.3.1.3. Kvantitativní real-time RT-PCR.....	53
3.3.2. Hodnocení kvantifikace a analýza dat real-time RT-PCR .....	56
3.4. Detekce rPER1 a rBMAL1 proteinů pomocí metody imunocytochemie .....	57
3.4.1. Imunocytochemie s využitím diaminobenzidinu (DAB) .....	57
3.4.1.1. Postup .....	60
3.4.1.2. Hodnocení rPER1 a rBMAL1 imunopozitivních buněk v tkáni kolorektální části tlustého střeva.....	61
3.4.2. Imunocytochemie s využitím sekundární protilátky značené fluorochromem.....	62
3.4.2.1. Postup .....	64
3.4.2.2. Hodnocení rBMAL1 fluorescenčně barvených buněk v tkáni kolorektální části tlustého střeva.....	65
3.5. Statistická analýza.....	66

4. VÝSLEDKY .....	67
4.1. Detekce exprese hodinových genů a genu <i>rWeel</i> v epitelu jednotlivých částí střeva potkana .....	67
4.1.1. Exprese hodinových genů v dvanáctníku, lačniku, kyčelníku a tlustém střevu během 24 hodin .....	67
4.1.1.1. Exprese hodinových genů v dvanáctníku.....	67
4.1.1.2. Exprese hodinových genů v lačniku .....	70
4.1.1.3. Exprese hodinových genů v kyčelníku .....	73
4.1.1.4. Exprese hodinových genů v tlustém střevu.....	76
4.1.2. Detekce a sledování lokalizace rPER1 a rBMAL1 proteinů v kolorektální části tlustého střeva .....	79
4.1.3. Exprese hodinových genů v dvanáctníku, lačniku, kyčelníku a tlustém střevu během 12 hodin .....	82
4.1.3.1. Exprese <i>rPer1</i> .....	82
4.1.3.2. Exprese <i>rPer2</i> .....	85
4.1.3.3. Exprese <i>rBmall</i> .....	88
4.1.3.4. Exprese <i>rRev-erb-α</i> .....	91
4.1.4. Exprese genu <i>rWeel</i> v dvanáctníku a tlustém střevu během 24 hodin .....	94
4.1.5. Exprese genu <i>rWeel</i> v dvanáctníku a tlustém střevu během 12 hodin .....	96
4.2. Vývoj rytmické exprese hodinových genů v epitelu tlustého střeva .....	99
4.2.1. Vývoj exprese <i>rPer1</i> .....	99
4.2.2. Vývoj exprese <i>rPer2</i> .....	102
4.2.3. Vývoj exprese <i>rBmall</i> .....	105
4.2.4. Vývoj exprese <i>rRev-erb-α</i> .....	107
4.2.5. Vývoj exprese <i>rClock</i> .....	110
4.2.6. Vývoj exprese <i>rCry1</i> .....	112
5. DISKUZE .....	114
5.1. Exprese hodinových genů a genu <i>rWeel</i> v epitelu jednotlivých částí střeva potkana .....	114
5.2. Vývoj rytmické exprese hodinových genů v epitelu tlustého střeva potkana .....	116
5.3. Význam získaných výsledků.....	117
6. SOUHRN.....	119
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	121

# 1. ÚVOD

Všechny živé organismy jsou vystaveny neustále se měnícím podmínkám vnějšího prostředí. U všech organismů také dochází k pravidelným změnám vnitřního prostředí těla. Chronobiologie je obor fyziologie zabývající se zkoumáním periodických změn v živých organismech. Tyto změny jsou známy jako biologické rytmy. Za nejdůležitější biologické rytmy jsou považovány rytmy cirkadiánní, jejichž perioda je přibližně 24 hodin. Cirkadiánní oscilace jsou generovány centrálním oscilátorem uloženým v suprachiasmatických jádrech hypotalamu, další oscilátory nalezneme i v periferních orgánech. Základní princip vzniku cirkadiánních oscilací je založen na rytmické expresi tzv. hodinových genů. S objevem hodinových genů v 90. letech minulého století je spojeno výrazné zvýšení zájmu o tento obor. Výjimečný rozvoj chronobiologie je umožněn využitím moderních metod molekulární biologie. Velký důraz je kladen na odhalení vzájemných vztahů oscilátorů a mechanismu jejich synchronizace s vnějším prostředím.

Obecným cílem této diplomové práce je shrnout základní poznatky o fungování biologických hodin uvnitř živých organismů, s podrobnějším zaměřením na jejich roli v periferních orgánech savců. V práci jsem se pokusila objasnit molekulární mechanismus synchronizace exprese hodinových genů v trávicím systému laboratorního potkana a prokázat, jak se tyto cirkadiánní oscilace v tlustém střevu laboratorního potkana vyvíjejí během ontogeneze. Dále jsem se zabývala otázkou cirkadiánní regulace cyklu buněčného dělení v buňkách střevního epitelu.

Jako jednotlivé cíle jsem si vytyčila:

1. Sledovat 24-hodinové a 12-hodinové profily exprese hodinových genů *rPer1*, *rPer2*, *rBmal1*, *rRev-erba*, *rClock* a *rCry1* v jednotlivých částech trávicího systému laboratorního potkana, tj. v dvanáctníku, lačníku, kyčelníku a tlustém střevu pomocí metody real-time RT-PCR.
2. Zjistit hladiny a lokalizace proteinů rPER1 a rBMAL1 v kolorektální části tlustého střeva potkana pomocí metody imunocytochemie.

3. Detekovat 24-hodinové a 12-hodinové profily exprese genu *rWeel* v dvanáctníku a tlustém střevu laboratorního potkana pomocí metody real-time RT-PCR.
4. Popsat vývoj rytmické exprese hodinových genů *rPer1*, *rPer2*, *rBmal1*, *rRev-erba*, *rClock* a *rCry1* během ontogenetického vývoje v tlustém střevu potkana pomocí metody real-time RT-PCR.

Část výsledků uvedených v předkládané práci byla publikována:

1/ Sládek M., Rybová M., Jindráková Z., Zemanová Z., Polidarová L., Mrnka L., O'Neil J., Pácha J., Sumová A.: Insight into circadian clock within the rat colonic epithelial cells. *Gastroenterology* 133: 1240-1249, 2007

2/ Sumová A., Bendová Z., Sládek M., El-Hennamy R., Matějů K., Polidarová L., Sosniyenko S., Illnerová H.: Circadian molecular clocks ticking along ontogenesis. *Physiol. Research, Review*, in press

## 2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1. Biologické rytmy

Biologické rytmy se rozdělují podle délky periody do tří skupin:

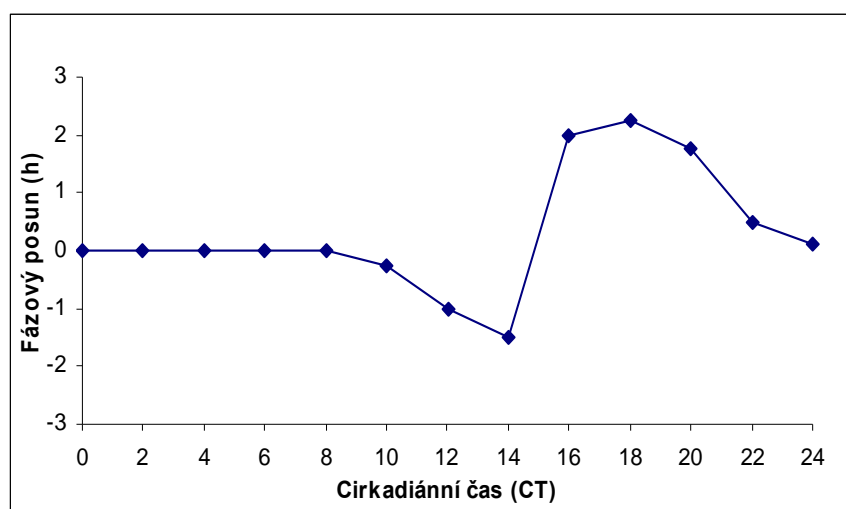
- a) ultradiánní rytmy mají periodu výrazně kratší než 24 hodin, patří sem např. dýchací rytmus, rytmy v srdeční a nervové činnosti a další;
- b) cirkadiánní rytmy mají periodu přibližně 24 hodin, sem patří rytmus spánku a bdění, rytmus v pohybové aktivitě, rytmus v tělesné teplotě, rytmus v hladině hormonů v krvi apod.;
- c) infradiánní rytmy mají periodu výrazně delší než 24 hodin, patří mezi ně menstruační a estrální rytmus a další (Illnerová 1995).

Rytmem nazýváme jev, kdy libovolná biologická proměnná opakovaně prochází určitou hodnotou. Perioda je doba mezi opuštěním a návratem rytmu do stejné fáze (Illnerová 1995). Fáze rytmu je okamžitý stav proměnné. Amplituda je hodnota označující polovinu rozdílu mezi maximem a minimem daného rytmu (Ali *et al.* 1992).

Cirkadiánní rytmy jsou rytmy endogenní. Jsou řízeny vnitřním oscilátorem neboli pacemakerem. Přetrvávají i ve zcela neperiodických podmínkách, ve kterých volně běží se svojí vnitřní periodou  $\tau$  (tau). Délka periody  $\tau$  je přibližně 24 hodin a je charakteristická pro každý druh (Aschoff 1960). Vnitřní, subjektivní čas organismu v neperiodických podmínkách se označuje jako cirkadiánní čas (circadian time, CT). Cirkadiánní hodina odpovídá délce  $\tau / 24$  hodin. CT0-CT12 označuje subjektivní den, CT12-CT24 označuje subjektivní noc. Světelný režim, kterému je organismus vystaven, může být světlo-tma (light-dark, LD), stálá tma (dark-dark, DD) nebo stálé světlo (light-light, LL) (Ali *et al.* 1992).

Za běžných podmínek je  $\tau$  synchronizována s 24-hodinovým dnem hlavně prostřednictvím střídání světla a tmy. Dalšími vnějšími synchronizátory (Zeitgeber) mohou být vnější teplotní rytmus, pohybová aktivita, sociální faktory a farmakologicky účinné látky (Illnerová 1995). Pro periferní oscilátory je nejdůležitějším synchronizátorem příjem potravy (Schibler *et al.* 2003).

Vystavíme-li oscilátor působení světla, dojde k fázovému posunu rytmu. Velikost fázového posunu, jako důsledek vystavení oscilátoru světelnému pulzu, je vyjadřována pomocí fázově responzní křivky (phase response curve, PRC) (Takahashi *et al.* 1984). Světelný stimul aplikovaný v první polovině subjektivní noci vyvolá fázové zpoždění (phase delay) oscilátoru. Naopak pokud vystavíme oscilátor světelnému stimulu během druhé poloviny noci, dojde k fázovému předběhnutí (phase advance). Osvětlení během subjektivního dne nevyvolá žádnou změnu ve fázi oscilátoru (Illnerová 1995) (obr. 1).



**Obr. 1:** Fázově responzní křivka (PRC). Na ose x je znázorněna doba aplikace světelného pulzu. Na ose y je vyznačena velikost fázového posunu (kladné hodnoty označují fázové předběhnutí, záporné hodnoty označují fázové zpoždění oscilátoru). Zpracováno dle údajů z literatury.

Perioda cirkadiánních rytmů je teplotně kompenzována, protože zůstává téměř nezměněna v širokém teplotním rozmezí.

Lze tedy shrnout, že cirkadiánní rytmy vykazují následující charakteristické znaky: jsou to rytmy endogenní, které přetrvávají i ve zcela neperiodických podmínkách, mohou být synchronizovány pomocí vnějšího světelného režimu a jejich perioda je teplotně kompenzována (Menaker et Wiesner 1983).



## 2.2. Cirkadiánní systém

Cirkadiánní systém se skládá z centrálního pacemakeru uloženého v mozku, vstupních a výstupních drah a periferních oscilátorů v různých tělních tkáních. Periferní oscilátory jsou autonomní, ale vyžadují centrální pacemaker k tomu, aby mohly být navzájem synchronizovány a také synchronizovány s vnějším světelným režimem (Balsalobre 2002).

Pacemaker je synchronizován vnějšími vstupními signály a generuje denní výstupní rytmy v chování a fyziologické aktivitě.

### 2.2.1. Suprachiasmatická jádra (SCN)

U savců je centrální pacemaker umístěn v suprachiasmatických jádrech (nucleus suprachiasmaticus, SCN) předního hypotalamu. SCN je párový orgán nacházející se dorzálně od optického chiasma a laterálně od třetí mozkové komory (Leak *et al.* 1999). Každé ze suprachiasmatických jader obsahuje shluky asi 10 000 neuronů. Většina z těchto neuronů vykazuje individuální rytmus v elektrické aktivitě a může být tudíž považována za samostatný oscilátor. Jednotlivé neurony jsou synchronizovány pomocí akčních potenciálů neuronálních synapsí a humorálních signálů. Celá suprachiasmatická jádra vykazují cirkadiánní oscilace v elektrické a metabolické aktivitě *in vivo* i *in vitro* (Welsh *et al.* 1995). Provedení léze SCN vede ke ztrátě schopnosti generovat cirkadiánní rytmy. Obnovit tuto schopnost lze transplantací fetálních nepoškozených SCN zvířatům s provedenou lézí. Výsledkem je obnovení rytmicity u recipienta. Cirkadiánní rytmy recipienta však budou probíhat s fází dárce (Silver et Schwartz 2005).

SCN se skládá ze dvou odlišných částí. Z ventrolaterální části (vlSCN) nazývané „core“ a z dorzomediální části (dmSCN) nazývané „shell“. Obě tyto části i obě suprachiasmatická jádra jsou vzájemně propojeny oboustrannými synapsemi. Pokusy s herpesvirem jako nástrojem pro transsynaptickou analýzu prokázaly, že signály jsou vedeny silněji ve směru z ventrolaterální části do dorzomediální (Leak *et al.* 1999). Pro ventrolaterální část je charakteristická produkce vasoaktivního intestinálního peptidu (vasoactive intestinal polypeptide, VIP) a gastrin uvolňovacího peptidu (gastrin releasing peptide, GRP). Pro dorzomediální část je charakteristická produkce arginin vasopresinu (arginin vasopressine, AVP). Navzdory rozdílům v produkci hormonů

se zdá, že všechny neurony SCN produkují kyselinu  $\gamma$ -aminomáselnou (GABA) (Moore et Speh 1993).

Kromě elektrické aktivity neuronů a syntézy peptidů je vhodným markerem pro sledování cirkadiánní rytmicity také hladina melatoninu. Melatonin je syntetizován z L-tryptofanu pomocí enzymu N-acetyltransferázy (NAT) v šišince (epifýze). Jeho hladina dosahuje maximálních hodnot během subjektivní noci. V SCN byly objeveny s G-proteiny spojené receptory Mel 1a a Mel 1b, na které se melatonin váže. Melatonin působí na SCN dvěma efekty. Skrze Mel 1a receptory inhibuje neuronální aktivitu. Skrze Mel 1a i Mel 1b receptory způsobuje fázové posunutí pacemakeru (Liu *et al.* 1997). Pomocí aplikace melatoninu lze nastavovat a synchronizovat vnitřní biologické hodiny. Podávání melatoninu zvečera způsobí předběhnutí pacemakeru, podávání melatoninu zrána způsobí zpoždění biologických hodin. Obecně melatonin informuje o vnitřním biologickém čase, nastavuje a synchronizuje biologické hodiny, zlepšuje kvalitu spánku atd. (Illnerová 1996).

Kromě epifýzy je melatonin produkován také entero-endokrinními buňkami mukózní sliznice gastrointestinálního traktu (GIT) (Raikhlin et Kvetnoy 1976). Zde je melatonin uvolňován do lumen střeva, vstřebáván, metabolizován játry a vyplavován spolu se žlučí do dvanáctníku (duodenum) (Klein 2004). I v gastrointestinálním traktu byly objeveny s G-proteiny spojené receptory, skrze které melatonin působí. Překvapivě bylo zjištěno, že v gastrointestinálním traktu se vyplavuje 500 krát více melatoninu než v epifýze. U zvířat, kterým byla odstraněna epifýza, je stále udržována hladina melatoninu v krvi díky jeho produkci v gastrointestinálním traktu (Huether *et al.* 1992). Gastrointestinální trakt tedy funguje jako extraepifyzární zdroj melatoninu (Bubenik *et al.* 1996).

Nejvýznamnějším markerem cirkadiánní rytmicity je sledování exprese tzv. hodinových genů (clock genes), kterým se budu podrobněji věnovat v dalších kapitolách.

### **2.2.2. Vstupní a výstupní dráhy centrálního oscilátoru**

Pro savce, včetně člověka, jsou oči a sítnice (retina) nezbytné pro synchronizaci s vnějším světelným režimem. Sítnice obsahuje tyčinky, čípky a gangliové buňky. Tyčinky a čípky jsou zodpovědné za vizuální fotorecepci. Při ztrátě tyčinek a čípků je organismus slepý, ale díky gangliovým buňkám retiny si zachovává schopnost

nevizuální fotorecepce. Gangliové buňky obsahují ftopigment melanopsin, který je zodpovědný právě za tento druh fotorecepce (Panda *et al.* 2003).

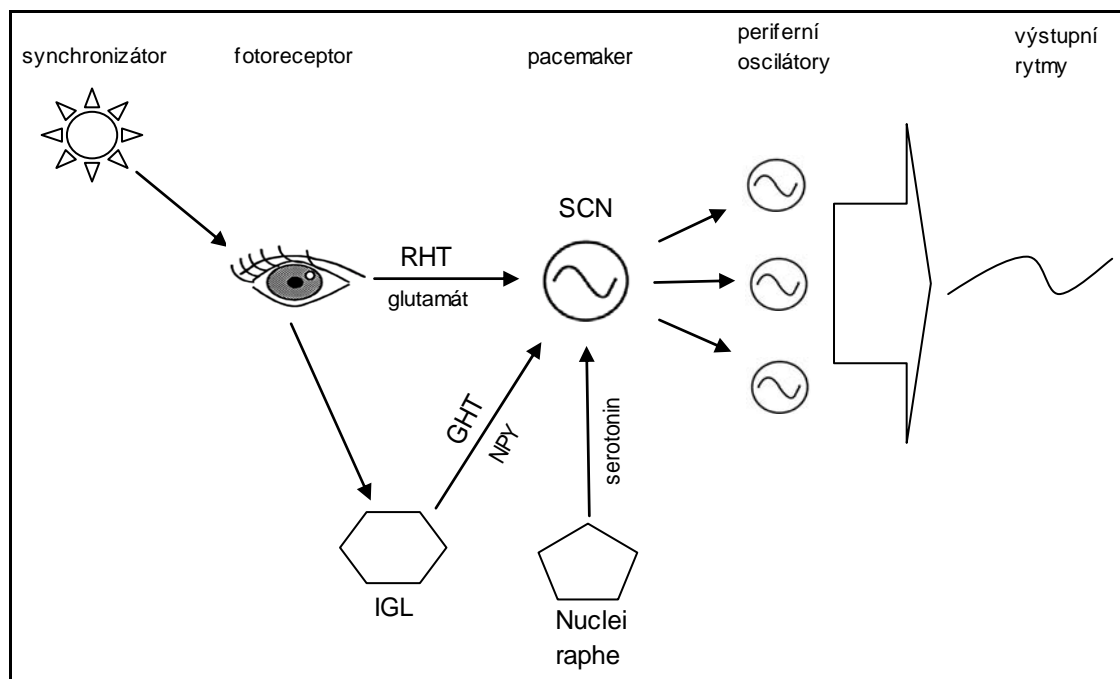
Suprachiasmatická jádra jsou synchronizována s vnějším 24-hodinovým dnem třemi cestami:

Světelný signál je veden přímo ze sítnice retinohypotalamickým traktem (RHT) do vlSCN. Hlavním mediátorem přenosu je zde glutamát. RHT obsahuje také hypofyzární adenylát cyklázu aktivující protein (pituitary adenylate cyclase-activating peptide, PACAP) a substanci P (SP), které modulují synchronizační proces (Chen *et al.* 1999, Hamada *et al.* 1999).

Světelný signál je do SCN veden z retiny také nepřímo přes intergenikulární lístek talamu (IGL) a odtud genikulohypotalamickým traktem (GHT) do vlSCN. Mediátorem přenosu je zde neuropeptid Y (NPY). Dalšími zde se uplatňujícími peptidy jsou kyselina  $\gamma$ -aminomáselná (GABA) a enkefalin (ENK) (Morin et Blanchard 1995).

Třetí cestou, přivádějící signály do SCN je dráha z „nuclei raphe“ středního mozku do vlSCN. Neurotransmitterem je zde serotonin (Leak *et al.* 1999).

Díky těmto drahám mohou být cirkadiánní rytmy v SCN synchronizovány s vnějším 24-hodinovým dnem. Výstupní dráhy, jimiž je rytmický signál předáván na periferii, vedou ze SCN do hypotalamu a dalších důležitých oblastí mozku, které regulují mnohé fyziologické procesy a změny v chování (Silver et Schwartz 2005) (obr. 2).



**Obr. 2:** Cirkadiánní systém savců. SCN (suprachiasmatická jádra), RHT (retinohypotalamický trakt), IGL (intergenikulární listek), GHT (genikulohypotalamický trakt), NPY (neuropeptid Y) a další hlavní neurotransmitery synchronizačních drah. Zpracováno dle údajů z literatury.

Světlo působící v první polovině noci způsobuje fázové zpoždění oscilátoru v SCN. V tuto dobu uvolněný glutamát působí přes N-metyl-D-aspartátové (NMDA) receptory a spouští MAP kinázovou (mitogen activated protein kinase) dráhu. Glutamát aktivuje ryanodinové receptory a indukuje tím vyplavení intracelulárních vápenatých iontů ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Vápník navázaný na kalmodulin pomáhá aktivovat MAP kinázu, která je zodpovědná za fosforylaci CREB (cAMP response element-binding protein). CREB spolu se svým koaktivátorem CBP/300 (CREB binding protein) indukuje genovou expresi navázáním na CRE vazebný element (cAMP response element) v promotorech genů. Světlo v druhé polovině noci způsobuje fázové předběhnutí. Indukce genové exprese světelným podnětem v této době zřejmě spočívá v glutamátě zvýšené produkci oxidu dusnatého (NO). Ten aktivuje guanylát cyklázu (GC) zodpovědnou za zvýšení cyklického guanozinmonofosfátu (cGMP), následnou aktivaci cGMP-dependentní protein kinázy (PKG) a fosforylaci CREB (Gillette et Tischkau 1999). Indukcí světlem se spouští např. exprese okamžitých časných genů (immediate early genes, IEGs) *c-fos*, *jun-B* a hodinových genů *Per1* a *Per2* (Kornhauser et al. 1990).

Jak již bylo zmíněno výše, cirkadiánní systém se kromě centrálního oscilátoru v SCN skládá také z periferních oscilátorů uložených v různých tělních tkáních. Cirkadiánní oscilace tedy můžeme pozorovat např. v srdci, játrech, plicích, ledvinách, kosterních svalech a dalších periferních orgánech. Existence periferních oscilátorů byla rozpoznána až po identifikaci hodinových genů. Principu fungování a regulace cirkadiánních oscilací v periferních orgánech se budu podrobněji věnovat v samostatné kapitole.

## **2.3. Molekulární mechanismus cirkadiánních oscilací**

Objevení hodinových genů a obecného principu jejich regulace znamenalo velké zvýšení zájmu o studium biologických hodin. Základní molekulární mechanismus cirkadiánních oscilací tvoří transkripční/translační zpětnovazebné smyčky. Mechanismu se účastní hodinové geny a jejich produkty, které představují buď pozitivní nebo negativní elementy ovlivňující transkripci. U různých organismů najdeme odlišné hodinové geny. U cyanobakterií byl objeven KaiC element jako klíčová komponenta mechanismu buněčných hodin (Dunlap 1999). U *Drosophily* jsou do regulace transkripce zapojeny pozitivní regulátory *dClock*, *dMall* a negativní regulátory *dPer*, *dTim*. U savců, konkrétně u myši, se negativní element zpětnovazebné smyčky skládá ze tří homologů *dPer* genů, *mPer1*, *mPer2*, *mPer3* a dvou homologů *Cry* genů, *mCry1*, *mCry2*. Pozitivní část smyčky tvoří mCLOCK a mBMAL1 (Shearman *et al.* 2000). Pozitivní elementy také ovlivňují transkripci hodinami řízených genů (clock controlled genes, CCGs), které pohánějí výstupní rytmy. Patří mezi ně např. již dříve zmíněný arginin vasopresin (AVP) a albumin D-element vázající protein (albumin D-element binding protein, DBP) (Reppert et Weaver 2001).

### **2.3.1. Strukturní motivy hodinových genů**

Proteiny uplatňující se v mechanismu zpětnovazebné smyčky jsou charakteristické vlastnictvím strukturního motivu PAS domény. PAS je akronym názvů prvních tří proteinů, u kterých byla tato doména objevena (PER *Drosophily*, lidský

ARNT a další protein *Drosophily* SIM). PAS doména má dimerizační funkci. Díky ní mohou proteiny interagovat a tvořit homodimery a heterodimery. Heterodimery CLOCK-BMAL1 se pomocí DNA vazebného motivu basic helix-loop-helix (bHLH) vážou na enhancerové oblasti v promotorech a intronech hodinových genů, tzv. E-boxy (6 kpb dlouhá sekvence 5'-CACGTG-3') a pozitivně nebo negativně tak regulují jejich transkripci (Jin *et al.* 1999). Při zkoumání *mPer1* promotoru byla objevena existence sekundárního iniciačního místa, tzv. D-Box, do kterého se vážou transkripční faktory (např. DBP, E4BP4) a usnadňují mCLOCK-mBMAL1 indukovanou transkripci genu (Yamaguchi *et al.* 2000b). Při zkoumání promotoru *Bmal1* genu byla nalezena dvě tzv. RORE místa (Rev/ROR response element), která fungují jako rozpoznávací sekvence pro ROR a REV-ERB proteiny. Promotor genu *Rev-erb-α* obsahuje kromě E-box sekvence také RevRE (Rev-erb response element) element, do kterého se mohou vázat ROR proteiny i sám REV-ERB-α (Harding et Lazar 1993).

### 2.3.2. Obecné schéma

Pozitivní část zpětnovazebné smyčky tvoří proteiny CLOCK a BMAL1 (někdy také nazýván jako MOP3) (Kume *et al.* 1999). Oba tyto proteiny obsahují PAS doménu a společně tvoří heterodimery. Heterodimery CLOCK-BMAL1 jsou pozitivními regulátory rytmické exprese tří *Per* genů (*Per1-3*) a dvou *Cry* genů (*Cry1* a *Cry2*). Oba tyto geny jsou exprimovány v přibližně stejnou denní dobu, a to zhruba v polovině subjektivního dne (Hastings *et al.* 2003). Produkty těchto genů jsou zahrnuty v negativní části zpětnovazebné smyčky. Heterodimery CLOCK-BMAL1 se pomocí bHLH DNA vazebného motivu vážou na E-boxy promotorů těchto genů a indukují jejich transkripci. Jakmile dosáhnou v cytoplazmě translatované produkty těchto genů, proteiny PER a CRY, kritické koncentrace, tvoří pomocí PAS domény heterodimery a jsou transportovány do jádra. Zde negativně regulují svoji vlastní transkripci tím, že inhibují pozitivní transkripční faktory CLOCK-BMAL1 (Reppert et Weaver 2001). PER proteiny mají pouze slabou schopnost samy se translokovat do jádra a inhibovat zde transkripční regulátory CLOCK-BMAL1. Esenciální pro tuto negativní regulaci je protein CRY, který se váže na heterodimer CLOCK-BMAL1 a inhibuje tak jeho interakci s promotorem transkribovaného genu. CRY je také nezbytný pro translokaci PER proteinu do jádra. Tyto vlastnosti CRY proteinu prokázaly i pokusy s reportérským genem luciferázou (Kume *et al.* 1999). Exprese genů *Per* a *Cry* probíhá v opačné fázi

než exprese genu *Bmal1*. *Per* a *Cry* dosahují maxima během subjektivního dne a *Bmal1* dosahuje maxima naopak během subjektivní noci (Reppert et Weaver 2001). Kromě *Per* a *Cry* genů je heterodimer CLOCK-BMAL pozitivním regulátorem rytmické exprese transkripčních faktorů REV-ERB- $\alpha$  a ROR $\alpha$ . REV-ERB- $\alpha$  ovlivňuje negativně a ROR $\alpha$  pozitivně expresi genu *Bmal1*. REV-ERB- $\alpha$  protein dosahuje maximálních hodnot během světlé části dne. Váže se na RORE DNA sekvenci v promotoru genu *Bmal1* a posouvá tím jeho transkripci do nočních hodin (Preitner *et al.* 2002). *Rev-erb-a* tak tvoří další negativní smyčku podílející se na tvorbě cirkadiánních oscilací. ROR $\alpha$  funguje jako transkripční aktivátor genu *Rev-erb-a* a *Bmal1*. V případě genu *Bmal1* se tak děje navázáním monomeru ROR $\alpha$  do jeho promotorové RORE sekvence, v případě *Rev-erb-a* genu se ROR $\alpha$  váže do jeho RevRE elementu (Preitner *et al.* 2002).

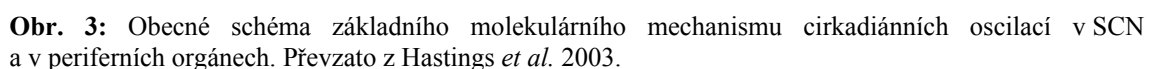
Lokalizace a délka života hodinových proteinů během 24-hodinového dne je také ovlivňována jejich posttranskripčními modifikacemi. Koncentrace PER, CLOCK a BMAL1 proteinů je během 24-hodinového dne silně ovlivňována fosforylací. Fosforylace proteinů má vliv na jejich stabilitu a jaderný transport. Ukázalo se, že fosforylace PER1 má zásadní vliv na tvorbu PER-CRY heterodimerů a jejich následnou lokalizaci do jádra. Konkrétně fosforylace urychluje degradaci v proteazomu a zpomaluje transport do jádra. Za fosforylaci PER1 proteinu je zodpovědná kasein kináza I epsilon (CKI $\epsilon$ , savčí ortolog proteinu DOUBLETIME u *Drosophily*). Jejím homolog kasein kináza I delta (CKI $\delta$ ) má také fosforylační schopnost. Fosforylované PER proteiny tvoří dimery ochotněji než nefosforylované. Naproti tomu CLOCK a BMAL spolu vzájemně interagují ve fosforylované i nefosforylované formě. Fosforylace je tedy velice důležitý jev pro udržení fungování cirkadiánního oscilátoru (Lee *et al.* 2001).

Na kontrole délky života CRY proteinů se také podílí FBXL3, který je součástí E3-ubiquitin ligázového komplexu. FBXL3 patří do rodiny proteinů obsahující tzv. F-box, což je přibližně 50 aminokyselin dlouhá sekvence důležitá pro vznik protein-protein interakcí. Mutace FBXL3 vede ke ztrátě jeho schopnosti vázat CRY proteiny, dochází k narušení degradace CRY proteinů, jejich stabilizaci a následně k dlouhotrvající represi aktivace hodinových genů. U myši nesoucích FBXL3 mutaci dochází k výraznému prodloužení cirkadiánní periody (Siepka *et al.* 2007).

Expresce hodinových genů je kromě heterodimeru CLOCK-BMAL1 regulována také modifikací histonů (acetylace, metylace, fosforylace, ubiquitinace) a strukturou chromatinu. Histonacetyláza (HAT) acetyluje lyzinové zbytky na N-konci histonů

Také hodinovými geny kontrolované geny (clock controlled genes, CCGs) jsou regulovány na stejném principu zpětnovazebné smyčky jako hodinové geny, což ukázaly pokusy s aktivací transkripce CCGs pro arginin vasopresin (AVP) pomocí CLOCK-BMAL1 heterodimeru. Potvrdilo se tedy spojení mezi základní zpětnovazebnou smyčkou hodinových genů a CCGs, které pohánějí výstupní rytmy (Jin *et al.* 1999). Stejný mechanismus transkripční/translační zpětnovazebné smyčky hodinových genů a CCGs se uplatňuje i v periferních orgánech. Exprese genů je zde ale zpožděna o 7-11 hodin vůči SCN. Periferní orgány se tedy nacházejí v odlišné fázi než SCN (Yamazaki *et al.* 2000) (obr. 3).

The diagram illustrates the circadian clock mechanism, showing the interaction between the nucleus and cytoplasm. In the nucleus, E-boxes and RORE elements regulate the expression of *Per*, *Cry*, CCGs, *Rev-Erba*, *Bmal1*, and *Clock*. In the cytoplasm, these proteins form complexes that inhibit the E-boxes and RORE elements, creating a negative feedback loop. The diagram also shows the output of the clock, including neuronal firing, neuropeptide secretion, behavioural state, and gene expression.





### 2.3.3. Hodinové geny

V 90. letech minulého století byla objevena existence hodinových genů u savců. Ukázalo se, že hodinové geny jsou základním kamenem molekulárního mechanismu cirkadiánních oscilací.

Hodinové geny byly zkoumány pomocí izolace cirkadiánních mutantů, které měly abnormální délku periody. První hodinový gen savců byl identifikován následkem cílené mutagenese v roce 1997 a nazván *Clock* (King *et al.* 1997). Ještě předtím byl popsán hodinový gen *Frq* (*frequency*) u houby *Neurospora Crassa* (Dunlap 1999). Molekulární mechanismus cirkadiánních hodin byl poprvé podrobněji popsán u *Drosophily melanogaster*. Ukázalo se, že jsou v něm zapojeny geny *dPer* a *dTim* (*timeless*), které negativně regulují svoji vlastní transkripci interakcí s dCLOCK-dBMAL1 heterodimery. Homology *Per* genů *Drosophily* pak byly následně objeveny i u savců (Jin *et al.* 1999). Na rozdíl od *Drosophily* myši *mTim* neosciluje zcela pravidelně a je exprimován v malém množství. Savčí mTIM protein na rozdíl od mCRY netvoří heterodimery s mPER (Kume *et al.* 1999).

#### ***Period* geny**

U savců se vyskytují tři *Per* geny, *Per1*, *Per2* a *Per3*. Všechny tři obsahují oblasti, které jsou do určité míry homologní. Protein mPER2 vykazuje 46% homologii s mPER1 proteinem. Protein mPER3 je ze 37 % homologní s mPER1 a mPER2 proteiny (Zylka *et al.* 1998). Kódující oblast *mPer1* genu je dlouhá 16 kpb a skládá se z 23 exonů. 5' oblast *mPer1* genu zahrnuje dva promotory, pět E-Box sekvencí, dvě DBP-vazebná místa a tři CRE místa (Hida *et al.* 2000). Také v *rPer1* genu bylo nalezeno pět E-Box sekvencí a dvě DBP-vazebná místa. mRNA genu *rPer1* je dlouhá 3870 kpb a kóduje protein o velikosti 1289 aminokyselin (Yamamoto *et al.* 2004). Alternativním sestřihem mohou vzniknout dvě rozdílné varianty *mPer1* RNA (Yamaguchi *et al.* 2000a). Transkripční jednotka *hPer2* genu se skládá z 23 exonů a je dlouhá přibližně 6 kpb (Toh *et al.* 2001). V oblasti promotoru *rPer2* genu byly nalezeny dvě E-box sekvence a dvě DBP-vazebná místa (Yamamoto *et al.* 2004). Protein mPER2 je dlouhý 1258 aminokyselin (Zylka *et al.* 1998). Kódující oblast *hPer3* genu je dlouhá přibližně 50 kpb a obsahuje 21 exonů (Ebisawa *et al.* 2001). Promotorová oblast *mPer3* i *rPer3* genu zahrnuje dvě DBP-vazebná místa (Yamamoto *et al.* 2004). Všechny tři

geny obsahují na 5' konci promotorovou oblast zahrnující E-box sekvenci CACGTG. Na tuto sekvenci se váže heterodimer CLOCK-BMAL1 a indukuje transkripci *Per* genů (Gekakis *et al.* 1998).

Rytmus v tvorbě PER proteinů je vůči mRNA zpožděn asi o 4-6 hodin. Všechny PER proteiny obsahují dimerizační PAS doménu, díky níž mohou tvořit homodimery (PER-PER) a heterodimery (PER-CRY). Proteiny také obsahují cytoplazmatickou lokalizační doménu (cytoplasmatic localization domain, CLD), která napomáhá jejich translokaci do jádra, jaderný lokalizační signál (nuclear localization signal, NLS), jaderný exportní signál (nuclear export signal, NES) a charakteristickou treonin-glycinovou repetici (tzv. Per repetice) v oblasti karboxylového konce (Sun *et al.* 1997). PER proteiny neobsahují bHLH doménu (Kume *et al.* 1999). Myši s poškozenými geny *mPer1* nebo *mPer2* vykazují narušený rytmus v pohybové aktivitě. Můžeme tedy usuzovat, že geny *mPer1* a *mPer2* jsou nezbytné pro generování cirkadiánních rytmů. Naproti tomu mutace v genu *mPer3* nezpůsobuje vážnější změny v tvorbě denních rytmů. Zdá se tedy, že gen *mPer3* není pro cirkadiánní systém esenciální (Okamura *et al.* 2002). Exprese *mPer3* genu není na rozdíl od exprese *mPer1* a *mPer2* genů během subjektivní noci indukovatelná světelným pulzem (Zylka *et al.* 1998). *mPer1* RNA dosahuje maximálních hodnot zhruba v polovině subjektivního dne, v CT4-CT6. *mPer2* RNA dosahuje maxima také v průběhu subjektivního dne, v CT8. Gen *mPer3* je nejvíce exprimován v čase CT4-CT8. Tyto hodnoty platí pro expresi genů v SCN, v periferních orgánech dosahují hladiny RNA daných genů maximálních hodnot o 3-9 hodin později v závislosti na druhu tkáně. *mPer1-3* dosahují v periferních orgánech maximálních hodnot na přelomu subjektivního dne a noci. Zhruba v polovině cirkadiánního dne, v CT12 (v periferních orgánech o 3-6 hodin později), jsou mPER proteiny spolu s mCRY proteiny transportovány do jádra a brzdí zde svoji vlastní transkripci působením na mCLOCK-mBMAL1 heterodimer. Protein mPER1 je nezbytný pro světlem indukované fázové posunutí oscilátoru (Reppert *et al.* 2001). mPER proteiny jsou schopny tvořit heterodimery pouze ve fosforylované formě. Fosforylace také pozitivně ovlivňuje degradaci mPER proteinů a zpomaluje tím jejich vstup do jádra (Lee *et al.* 2001).

### ***Cryptochrome* geny**

U savců najdeme dva *Cry* geny, homology *Cry1* a *Cry2*. Tyto dva geny jsou ortology genů rostlinných cirkadiánních receptorů. Hrají důležitou roli v cirkadiánní fotorecepci *Drosophily* (Wisor 2002). Proteiny mCRY o velikosti 605 aminokyselin a protein mCRY2 o velikosti 569 aminokyselin vykazují 73% homologii. *mCry* geny obsahují pro rostliny charakteristickou pterinovou a flavinovou skupinu. Jsou to strukturní homology DNA opravného enzymu DNA fotolyázy, ale postrádají její opravnou funkci. *Cry* geny obsahují funkční CACGTG E-box sekvenci (Kume *et al.* 1999).

*mCry1* gen vykazuje jasný cirkadiánní rytmus a je exprimován téměř synchronně s genem *mPer2* pomocí pozitivní regulace transkripčního faktoru mCLOCK-mBMAL1. *mCry1* RNA dosahuje maximálních hodnot během subjektivního dne, v CT10. Naproti tomu *mCry2* nevykazuje v SCN pravidelný cirkadiánní rytmus, zatímco v periferních orgánech je exprimován rytmicky. Produkty *Cry* genů, CRY proteiny, tvoří pomocí PAS domény heterodimery s PER proteiny, jsou transportovány do jádra a inhibují zde transkripci svoji vlastní i transkripci *Per* genů. CRY protein je nezbytný pro fungování negativní části zpětnovazebné smyčky, sám PER protein inhibuje heterodimer CLOCK-BMAL1 pouze velmi slabě a má i slabou translokační schopnost (Kume *et al.* 1999). Bylo zjištěno, že mCRY protein inhibuje ubiquitinaci a následnou degradaci mPER proteinu v proteazomu (Okamura *et al.* 2002). mCRY protein také ovlivňuje stabilitu mPER2 proteinu (Cermakain *et al.* 2002). Cílená delece genu *mCry1* má za následek zkrácení periody rytmů. Zatímco delece genu *mCry2* má naopak vliv na prodloužení periody rytmů. Proteiny *mCry1* nebo *mCry2* mutantů mají také pozměněnou schopnost tvořit heterodimery s mPER proteiny. Mutace v obou dvou genech má za následek totální ztrátu cirkadiánní rytmicity. Tyto geny se tudíž zdají být esenciální pro fungování cirkadiánního oscilátoru (Kume *et al.* 1999).

### ***Clock* gen**

Gen *Clock* byl prvním nalezeným hodinovým genem u savců. *mClock* tvoří rozsáhlou transkripční jednotku o velikosti 100 kpb s 24 exony (King *et al.* 1997). Expresí *mClock* genu mohou pomocí alternativního sestřihu vzniknout dva různé mCLOCK proteiny o molekulové hmotnosti 120 kDa a 105 kDa (Lee *et al.* 1999). Protein CLOCK obsahuje PAS doménu, pomocí které je schopen tvořit heterodimery

s BMAL1 proteinem. CLOCK obsahuje také bHLH DNA vazebnou doménu (King *et al.* 1997).

S pomocí bHLH DNA vazebné domény se CLOCK spolu s BMAL1 váže na E-boxy promotorů genů *Per* a *Cry* a funguje jako jejich pozitivní transkripční faktor. PER a CRY potom zpětně inhibují svoji vlastní transkripci skrze odstranění CLOCK-BMAL1 heterodimeru z E-boxu svých genů (Reppert et Weaver 2001). Zdá se, že koncentrace *mClock* mRNA i proteinu mCLOCK zůstává v SCN během 24 hodin konstantní (Lee *et al.* 1999). Zatímco v periferních orgánech, např. ve vejcovodu, byly prokázány cirkadiánní oscilace tohoto genu (Kennaway *et al.* 2003). Jak již bylo zmíněno výše, aktivita hodinových proteinů je ovlivňována fosforylací. Bylo zjištěno, že jak fosforylovaný, tak nefosforylovaný protein CLOCK je schopen tvořit heterodimery s proteinem BMAL1. Interagovat s PER a CRY proteiny je ale schopný pouze fosforylovaný CLOCK (Lee *et al.* 2001). U *Clock/Clock* mutantní myši nebyl pozorován rytmus v expresi *mCry1* RNA, z čehož vyplývá, že rytmus *mCry1* genu je závislý na funkčním mCLOCK proteinu. Tato teorie byla potvrzena v SCN i v periferních orgánech (Kume *et al.* 1999). Obdobně bylo zjištěno, že amplituda rytmů všech tří *mPer* mRNA je značně redukována u *Clock/Clock* mutantní myši (Jin *et al.* 1999). V játrech *Clock/Clock* mutantní myši vykazuje gen *mRev-erb-a* postupně snížení amplitudy spolu s fázovým posunem rytmu až dokonce úplnou arytmiicitu. Rytmus genu *mRev-erb-a* je tudíž také závislý na funkčním mCLOCK proteinu (Vitaterna *et al.* 1994). *Clock* mutace ovlivňuje délku endogenní periody v neměnných podmínkách, a také přetrvání cirkadiánních oscilací v konstantní tmě. Bylo objeveno, že *Clock* mutace je způsobena transverzí adeninu za tymin, která má za následek vynechání exonu při sestřihu nascentního transkriptu a delecí 51 aminokyselin z transkripčně aktivační domény CLOCK proteinu. Mutované mCLOCK proteiny mohou sice dál tvořit heterodimery s mBMAL1, ale mají sníženou schopnost aktivovat transkripci. Z toho vyplývá, že mCLOCK protein je esenciální pro transkripční aktivitu komplexu mCLOCK-mBMAL1 (King *et al.* 1997). Transkripční faktor NPAS2 (neuronal PAS domain protein 2) je strukturně příbuzný CLOCK proteinu. Pokusy s NPAS2-BMAL1 heterodimery prokázaly, že NPAS2 může fungovat jako funkční zástupce CLOCK proteinu. Ve spolupráci s BMAL1 je schopen indukovat transkripci *Per*, *Cry* genů a inhibovat transkripci *Bmal1* genu (Reick *et al.* 2001).

Pracovní skupina DeBruyne *et al.* ve své studii zpochybňuje základní molekulární mechanismus cirkadiánních oscilací s CLOCK proteinem fungujícím jako

pozitivní transkripční faktor *Per* a *Cry* genů. Překvapivě zjistili, že u *Clock/Clock* mutantní myši přetrvává jasný cirkadiánní rytmus v pohybové aktivitě. Přestože molekulární mechanismus zpětnovazebné smyčky u *Clock/Clock* mutantní myši dále funguje, hladiny mRNA hodinových genů a jejich proteinů v SCN i v periferních orgánech vykazují změny oproti hodnotám u nemutovaných myší. Tyto výsledky naznačují, že mCLOCK protein pravděpodobně ovlivňuje velikost amplitudy exprese hodinových genů (DeBruyne *et al.* 2006). Výsledky zpochybňují nezbytnost mCLOCK-mBMAL1 heterodimerů pro fungování mechanismu zpětnovazebné smyčky a zároveň naznačují, že role CLOCK proteinu může být zastoupena např. NPAS2 proteinem.

V loňském roce bylo objeveno, že protein CLOCK má vnitřní histon acetyltransferázovou (HAT) aktivitu. Tato jeho enzymatická funkce přispívá k remodelaci chromatinu zahrnuté v cirkadiánní regulaci genové exprese. CLOCK protein je schopen acetylovat také substráty nehistonové povahy. V myších játrech mCLOCK protein specificky acetyluje protein mBMAL1 na lyzinu 537. Tvorba heterodimeru mCLOCK-mBMAL1 je pro mBMAL1 acetylaci nezbytná. mBMAL1 acetylace vykazuje jasný cirkadiánní rytmus s maximem během světlé části dne. Acetylace mBMAL1 usnadňuje navázání mCRY1 proteinu na heterodimer mCLOCK-mBMAL1 a následnou represí transkripce (Hirayama *et al.* 2007).

### ***Bmal1* gen**

Díky alternativnímu sestřihu mohou vzniknout 3 varianty *mBmal1*: *mBmal1b*, *mBmal1b'*, *mBmal1g'*. U myši jsou funkční proteiny tvořeny pouze variantou *mBmal1b* a *mBmal1b'* (Yu *et al.* 1999). Kódující oblast *mBmal1* genu je dlouhá 110 kpb a je tvořena 23 exony (Yu *et al.* 2002). Při zkoumání promotoru *Bmal1* genu byla nalezena dvě RORE místa (Rev/ROR response element) o délce 10 kpb a 11 kpb obsahující konzervovanou sekvenci WAWNTRGGTCA (W= A nebo T a R= A nebo G). Tato místa fungují jako rozpoznávací sekvence pro ROR a REV-ERB proteiny z rodiny jaderných sirotčích receptorů (tzv. nuclear orphan receptors) (Harding et Lazar 1993).

Expresi genu *Bmal1* vykazuje jasný cirkadiánní rytmus (Cermakain et Sassone-Corsi 2002). REV-ERB- $\alpha$  se váže na RORE sekvenci promotoru genu *Bmal1* a funguje jako hlavní regulátor cyklické transkripce tohoto genu v SCN i periferních orgánech (Preitner *et al.* 2002). *Rev-erb- $\alpha$*  je gen, který je kontrolovaný CLOCK-BMAL1

heterodimerem. REV-ERB- $\alpha$  dosahuje maximálních hodnot v průběhu subjektivního dne, zatímco *Bmal1* RNA ve stejnou dobu dosahuje hodnot minimálních. REV-ERB- $\alpha$  tedy svojí interakcí s RORE sekvencí genu *Bmal1* posouvá jeho expresi do subjektivní noci (Hastings *et al.* 2003). Gen *mBmal1* je exprimován v opačné fázi než geny *mPer* a *mCry*. I z toho vyplývá, že exprese genu *mBmal1* je regulována odlišným mechanismem než exprese genů *mPer* a *mCry*. Transkripce genu *Bmal1* je nepřímo pozitivně regulována PER2. PER2 inhibuje *Rev-erb-a* gen, který se následně nemůže účastnit negativní regulace *Bmal1* genu (Preitner *et al.* 2002). Hladina *mBmal1* mRNA dosahuje v SCN maximálních hodnot v průběhu subjektivní noci, mezi CT15-CT18, v periferních orgánech dosahuje maxima na počátku subjektivního dne. BMAL1 protein, někdy také nazýván jako MOP3, JAP3, ARNT3 (Kume *et al.* 1999), obsahuje PAS doménu i bHLH DNA vazebnou doménu. Tvoří heterodimery s CLOCK a váže se na E-boxy promotorů genů. Společně fungují jako pozitivní regulátory transkripce genů *Per* a *Cry*. CLOCK-BMAL1 heterodimer inhibuje v jádře expresi *Bmal1*. Proteiny PER a CRY fungují jako negativní regulační faktory heterodimeru CLOCK-BMAL1. Konkrétně CRY ruší interakci CLOCK-BMAL1 s promotorem genu. (Reppert *et al.* 2001). U *Bmal1* mutantní myši dochází k úplné ztrátě tvorby cirkadiálních rytmů (Bunger *et al.* 2000). Aktivita heterodimerů mCLOCK-mBMAL1 může být modulována přes jaderné receptory spojené s hormony nebo redoxním potenciálem (Schibler *et al.* 2005). Heterodimerizace je též ovlivňována fosforylací. Jak fosforylovaný, tak nefosforylovaný BMAL1 je schopen tvořit heterodimery s CLOCK. Z toho můžeme usuzovat, že fosforylace není pro tvorbu CLOCK-BMAL1 heterodimerů nezbytně nutná (Lee *et al.* 2001).

### ***Rev-erb-a* gen**

Gen *Rev-erb-a* známý také jako *Ear1* patří do velké rodiny transkripčních faktorů nazývaných jaderné sirotčí receptory (tzv. nuclear orphan receptors), které jsou strukturně podobné receptorům pro thyroidní hormony (TR) a receptorům pro kyselinu retinovou (RAR). *Rev-erb-a* je kódován opačným vláknem DNA stejného lokusu jako TR, tímto způsobem je pravděpodobně regulována jejich translace. Stejně jako TR a RAR, i REV-ERB- $\alpha$  obsahuje vazebnou DNA doménu tvořenou dimerizačním strukturním motivem zinkový prst. Pro jaderné sirotčí receptory nebyl ještě dosud objeven odpovídající vazebný ligand (Harding *et al.* 1993). Lidský i potkaní gen

*Rev-erb-α* existuje ve dvou mRNA izoformách, *Rev-erb-α1* a *Rev-erb-α2*. Obě formy jsou transkribovány ze dvou odlišných promotorů P1 a P2. Transkripce genu *Rev-erb-α1* je zahajována z promotoru P1, transkripce genu *Rev-erb-α2* je zahajována z promotoru P2. P1 promotor obsahuje jeden E-box tvořený sekvencí CACGTG a dva E-boxy tvořené sekvencí CACATG. Čtyři CACGTG E-box sekvence a jedna CACATG sekvence byly nalezeny v promotoru P2. Oba promotory jsou aktivovány CLOCK-BMAL1 heterodimerem a inhibovány CRY a PER proteiny (Triqueneaux *et al.* 2004). Další oblastí nalezenou v promotoru je RevRE (Rev-erb response element), který tvoří 5 kpb dlouhá A/T bohatá oblast následovaná sekvencí AGGTCA. Do této oblasti se kromě ROR transkripčních aktivátorů váže i samotný REV-ERB-α a negativně reguluje svoji vlastní transkripci (Harding et Lazar 1993).

Jak již bylo zmíněno dříve, exprese genu *Rev-erb-α* je pozitivně regulována heterodimerem CLOCK-BMAL1 a negativně regulována proteiny PER a CRY. Hladina mRNA *Rev-erb-α* vykazuje jasný cirkadiánní rytmus, dosahuje v SCN maxima v průběhu subjektivního dne, podobně jako mRNA genů *Per1*, *Per2*, *Cry1*. REV-ERB-α negativně reguluje svoji vlastní transkripci skrze inhibici heterodimeru CLOCK-BMAL1 (Preitner *et al.* 2002). Paralog genu *Rev-erb-α*, gen *Rev-erb-β*, také vykazuje cirkadiánní rytmus v expresi mRNA v SCN a různých periferních orgánech, zároveň funguje jako inhibitor exprese *Rev-erb-α* genu (Forman *et al.* 1994, Triqueneaux *et al.* 2004). REV-ERB-α je hlavním regulátorem uplatňujícím se při expresi genu *Bmal1*, působí zde především jako sekvenčně specifický represor (Forman *et al.* 1994, Harding et Lazar 1993). Při negativní regulaci transkripce genu *Bmal1*, REV-ERB-α kompetuje o jeho promotorové RORE vazebné místo s dalšími transkripčními faktory z rodiny jaderných sirotčích receptorů (RORα, RORβ, RORγ) (Forman *et al.* 1994). U *Rev-erb-α/Rev-erb-α* mutantní myši byl pozorován slabý rytmus a nízká amplituda v expresi *mBmal1* RNA. Z toho vyplývá, že mREV-ERB-α je nezbytný pro tvorbu cirkadiánních oscilací genu *mBmal1*. REV-ERB-α se také v menší míře podílí na regulaci exprese genů *Clock*, *Cry1*, *Cry2* a *Per2*. Mutace v genu *mRev-erb-α* nezpůsobí téměř žádné pozorovatelné změny v expresi genů *mPer2* a *mCry2*, větší vliv má pouze na expresi genů *mClock* a *mCry1*. *mCry1* RNA vykazuje sníženou amplitudu rytmu a *mClock* RNA žádnou rytmicitu nevykazuje. Na rozdíl od hladiny mRNA, proteiny mBMAL1 a mCLOCK vykazují vysoké hladiny i u mutantních jedinců. Při umístění *Rev-erb-α/Rev-erb-α* mutantní myši do otáčivého kola (running wheels) bylo zjištěno, že snížená exprese genů *mBmal1* a *mClock* nevede

k ztrátě cirkadiánního rytmu v pohybové aktivitě, dochází však k zkrácení délky periody a změně fáze rytmu u zvířat držených v LL i DD podmínkách. *Rev-erb- $\alpha$*  tedy není esenciální pro tvorbu cirkadiánních oscilací, podílí se však na modulaci délky periody a fázi rytmu cirkadiánního systému (Preitner *et al.* 2002). Nedávno bylo zjištěno, že protein REV-ERB- $\alpha$  je fosforylován a tím stabilizován pomocí GSK3 $\beta$  (glycogen synthase kinase 3 $\beta$ ) (Schibler 2007).

### **Ror geny**

Geny *Ror* (*Rora*, *Rorb*, *Rory*) z rodiny ROR/RZR (retinoic acid related orphan receptors) patří stejně jako gen *Rev-erb- $\alpha$*  mezi jaderné sirotčí receptory, pro které nebyl ještě doposud objeven odpovídající vazebný ligand (Forman *et al.* 1994). Alternativním sestřihem mohou vzniknout tři odlišné izoformy ROR $\alpha$ 1, ROR $\alpha$ 2, ROR $\alpha$ 3 (Giguere *et al.* 1994).

ROR fungují jako transkripční aktivátory genů *Rev-erb- $\alpha$*  a *Bmal1*. V případě genu *Bmal1* se tak děje navázáním monomeru ROR do jeho promotorové RORE sekvence, v případě *Rev-erb- $\alpha$*  genu se ROR váže do jeho RevRE elementu (Preitner *et al.* 2002). U myši byla detekována exprese všech tří *mRor* genů. V játrech jsou transkribovány geny *mRora* a *mRory* (Panda *et al.* 2002). Naproti tomu gen *mRorb* je exprimován výhradně v SCN (Park *et al.* 1996). Zatímco hladina *mRora* zůstává v játrech během dne konstantní, mRNA *mRory* vykazuje cirkadiánní oscilace. Všechny *Ror* geny jsou exprimovány v opačné fázi než gen *Rev-erb- $\alpha$*  (Preitner *et al.* 2002). Homozygotní mutantní myš pro gen *mRora*, tzv. *staggerer*, vzniká delecí uvnitř kódující oblasti, která má za následek vznik zkráceného nefunkčního proteinu (Dussault *et al.* 1998). V této mutantní myši dochází k snížení exprese genu *mBmal1*, z čehož vyplývá, že ROR $\alpha$  je nezbytný pro aktivaci transkripce tohoto genu (Jetten *et al.* 2001).

### **Kasein kináza I epsilon**

Savčí gen *CKI $\epsilon$*  je ortolog genu *Dbt* (*doubletime*) u *Drosophily*. Je to serin/threoninová protein kináza, která obsahuje C-koncovou regulační doménu (Eide et Virshup 2001).

Expres *CKI $\epsilon$*  byla prokázána v SCN i v periferních orgánech, ale nevykazuje žádný cirkadiánní rytmus (Lee *et al.* 2001). *CKI $\epsilon$*  je zodpovědná za regulaci fosforylace



hodinových proteinů, jejich ubiquitinaci, následnou degradaci v proteazomu a maskování jejich jaderného lokalizačního signálu. Tím je omezena funkce negativní části zpětnovazební smyčky (Lee *et al.* 2001, Lowrey *et al.* 2000). Fosforylace má vliv na 24-hodinové změny v hladinách proteinů. Fosforylace PER1 a PER2 proteinů pomocí CKIε ovlivňuje tvorbu heterodimerů s CRY proteiny a jejich společnou translokaci do jádra. Preferenčně heterodimerizuje fosforylovaný PER1. Fosforylovaný PER1 zároveň ochotněji interaguje s CLOCK-BMAL1 než jeho nefosforylovaná forma. Stejně tak jako CKIε, i homologní CKIδ je schopna fosforylovat proteiny PER, CRY a BMAL1 (Lee *et al.* 2001). Aktivita CKIε je regulována inhibiční autofosforylací (Partch *et al.* 2006). Důležitost fosforylace pro fungování centrálního mechanismu zpětnovazební smyčky byla objevena pomocí pokusů s *tau* mutantním křečkem. Spontánní, semidominantní cirkadiánní mutace *tau* způsobuje výrazné zkrácení cirkadiánní periody (Ralph et Menaker 1988). Pomocí klonování a genetické analýzy bylo zjištěno, že lokus *tau* je zodpovědný za kódování CKIε. Záměnou argininu za cystein vzniká substituční mutace. Deficientní enzym CKIε je sice schopen vázat mPER proteiny, ale fosforyluje je se sníženou efektivitou. To má za následek rychlejší akumulaci mCRY-mPER komplexů v cytoplazmě a jejich rychlejší vstup do jádra (Lowrey *et al.* 2000). Autosomálně dominantní mutace *hPer2* genu způsobuje dědičný syndrom fázového předběhnutí spánku (Familial Advanced Sleep Phase Syndrom, FASPS), který se projevuje 4 hodinovým fázovým předběhnutím cirkadiánních hodin. U mutací postižených jedinců dochází vinou náhrady adeninu za guanin k substituci aminokyseliny serinu za glycin uvnitř CKIε vazebného místa hPER2 proteinu. CKIε hůře rozeznává mutované fosforylační místo na hPER2 a fosforyluje protein s nižší účinností. Výsledkem je narušení degradace hPER2 proteinu, jeho rychlejší vstup do jádra a zkrácení endogenní periody (Toh *et al.* 2001). Obecně tedy fosforylace destabilizuje hodinové proteiny, snižuje jejich schopnost tvořit funkční heterodimery a translokovat se do jádra.

#### **2.3.4. Hodinami kontrolované geny (CCGs)**

Role CCGs spočívá v přenosu rytmického signálu generovaného transkripčně/translačními smyčkami na fyziologické funkce organismu. Bylo zjištěno, že exprese CCGs je regulována stejným centrálním molekulárním mechanismem jako exprese hodinových genů, avšak proteinové produkty CCGs nejsou, na rozdíl

od produktů hodinových genů, pro fungování pacemakeru esenciální. Některé CCGs jsou regulovány skrze své E-boxy CLOCK-BMAL1 heterodimerem stejně jako hodinové geny (Reppert et Weaver 2001).

### ***Avp* gen**

Jedním z hodinami řízených genů je neuropeptid arginin vasopresin (AVP). AVP jako hormon ovlivňuje hospodaření lidského těla s vodou a solemi. Jako CCG je *Avp* řízen pouze v SCN, v ostatních částech mozku je jeho exprese regulována odlišným způsobem (Jin *et al.* 1999). AVP působí jako neuropřenašeč v dorzomediální části SCN (Leak *et al.* 1999). Odtud se AVP dostává do dorzomediální části hypotalamu (DMH) a paraventriculárního jádra (PVN), kde ovlivňuje produkci hormonů kůry nadledvin, konkrétně kortikosteronu. AVP se tedy podílí na řízení rytmické aktivity hypotalamo-hypofyzární nadledvinkové dráhy (hypotalamo-pituitary-adrenal axis, HPA) (Kalsbeek *et al.* 1996). Uvolňovaný peptid působí v SCN přes vasopresin-V1 receptory a moduluje zde rytmus v elektrické aktivitě (Mihai *et al.* 1994). Promotor *Avp* genu obsahuje CACGTG E-box sekvenci v pozici -154 až -149.

Exprese *Avp* genu dosahuje v SCN maximálních hodnot během subjektivního dne, minimálních hodnot dosahuje během subjektivní noci a je tedy synchronizována s expresí *Per1*. Studie *Avp* promotoru pomocí reportérského genu luciferázy prokázaly, že exprese je pozitivně regulována CLOCK-BMAL1 aktivací CACGTG sekvence E-boxu. Transkripce může být inhibována PER a CRY proteiny. Z toho vyplývá, že *Avp* gen je pod přímou kontrolou hodinových genů. AVP protein se neúčastní negativní regulace exprese svého vlastního genu. U *Clock/Clock* mutantní myši dochází k vymizení rytmu v expresi *mAvp*, transkribovaná mRNA dosahuje pouze nízkých hladin (Jin *et al.* 1999). Tzv. *Brattleboro* homozygotně mutantní potkani stále vykazují rytmus v expresi *rAvp*, *rAvp* však rytmuje se sníženou amplitudou (Uhl et Reppert 1986).

### ***Dbp* gen**

Dalším z hodinami řízených genů je albumin D-element vazebný protein (albumin D-element binding protein, DBP). *mDbp* gen je tvořen čtyřmi exony, ve druhém intronu byly nalezeny dvě E-box sekvence (Yamaguchi *et al.* 2000b).

*Dbp* vykazuje v SCN jasný cirkadiánní rytmus v LD i DD podmínkách. Amplituda a fáze rytmu *Dbp* je podobná jako u *Per1*, na rozdíl od *Per1* genu však není jeho exprese ovlivňována světelnými podmínkami (Lopez-Molina *et al.* 1997). Hladina *Dbp* mRNA dosahuje v SCN maxima během subjektivního rána (CT4), minima během časně subjektivní noci. Proteosyntéza je vůči transkripci zpožděna o 2 hodiny, v porovnání s PER1 je tedy translace a transport do jádra mnohem rychlejší. Hladina DBP proteinu dosahuje nejvyšších hodnot v CT6, minima pak za svítání v CT0. V játrech najdeme obdobný rytmus *Dbp* (Yamaguchi *et al.* 2000b). DBP je typický CCGs nacházející se v periferních orgánech, reguluje např. rytmickou transkripci klíčových enzymů zapojených do metabolismu v hepatocytech jater jako jsou albumin, cholesterol, 7- $\alpha$  hydroxyláza a cytochrom P450 (Ripperger *et al.* 2000). Při zkoumání *mPer1* promotoru se zjistilo, že DBP se v oblasti -28 až -37 váže do jeho sekundárního iniciačního místa (D-Box) a usnadňuje mCLOCK-mBMAL1 indukovanou transkripci genu. mCLOCK-mBMAL1 zároveň spouští transkripci *mDbp* genu skrze E-box jeho sekundárního intronu. Transkripce *mDbp* je inhibována mPER a mCRY proteiny. (Yamaguchi *et al.* 2000b). DBP není nutný pro expresi vlastního genu (Lopez-Molina *et al.* 1997). Tento protein je charakteristický obsahem DNA vazebné domény leucinového zipu (bZIP) a PAR domény bohaté na prolin a kyselé aminokyseliny.

Do této rodiny patří také DBP paralogy HLF (hepatic leukocyte factor) a TEF (thyrotropic embryonic factor), které fungují jako transkripční aktivátory mnohých genů především v játrech a ledvinách (Yamaguchi *et al.* 2000a, Ripperger *et al.* 2000). V těchto orgánech regulují především expresi genů kódujících enzymy klíčové pro buněčnou obranu proti xenobiotikům a působení volných radikálů (Gachon *et al.* 2006). Všechny tři geny vykazují cirkadiánní rytmicitu s identickou fází v SCN i v periferních orgánech (Yamaguchi *et al.* 2000a, Ripperger *et al.* 2000). Ztráta jednoho z těchto genů vede k malým změnám ve fenotypu jedince. Ztráta všech tří genů vede k výraznému zkrácení délky života daného jedince. DBP, HLF a TEF tedy nejsou základními komponentami oscilátoru, spíše řídí a modulují jeho výstupní rytmy (Schibler 2005).

## 2.4. Periferní orgány

Jak již bylo zmíněno dříve, exprese hodinových genů probíhá nejen v SCN, ale také v periferních orgánech jako jsou kosterní svaly, srdce, játra, plíce, ledviny a další. Dlouhou dobu byla za jedinou další strukturu, která obsahuje biologické hodiny kromě SCN považována retina. Retina vykazuje jasný cirkadiánní rytmus v expresi melatoninu, který je synchronizovatelný světlem. Později bylo objeveno, že i všechny tři *mPer* geny jsou rytmicky exprimovány v oku. Exprese je o 3-6 hodin zpožděna vůči SCN (Zylka *et al.* 1998). *mPer* geny jsou exprimovány také v ostatních oblastech mozku a periferních orgánech. Jejich exprese i exprese ostatních hodinových genů je vůči SCN zpožděna o 3-9 hodin v závislosti na druhu tkáně. Např. hladina *mBmall* RNA dosahuje maxima na začátku subjektivního dne, hladiny *mPer* genů dosahují maximálních hodnot na přelomu subjektivního dne a noci. Jejich rytmus je tedy v protifázi stejně jako v SCN (Balsalobre 2002). Usuzovalo se, že periferní orgány jsou buďto přímo řízeny, nebo synchronizovány SCN. U potkanů, kterým byla provedena léze SCN, došlo v periferních orgánech k vymizení rytmu v expresi genu *rPer2* a ke ztrátě rytmu v pohybové aktivitě, což naznačovalo, že periferní orgány jsou pod přímou kontrolou SCN (Sakamoto *et al.* 1998, Shibata 2004). Nebylo však možno přesně rozlišit, zda dochází k úplné ztrátě rytmicity nebo pouze k desynchronizaci jednotlivých buněčných oscilátorů (Reppert et Weaver 2001).

U transgenních potkanů, kterým byl za *rPer1* promotor vložen reportérský gen luciferáza, došlo v kultuře buněk *in vitro* k snížení amplitudy rytmů v periferních orgánech po 2-7 dnech. V kultuře buněk SCN přetrvával jasný rytmus až po dobu 32 dnů. Výměna média při kultivaci buněk periferních orgánů vedla k obnovení rytmicity. Reiniciace je pravděpodobně zapříčiněna odstraněním toxických látek a šokem spojeným se změnou teploty, pH atd. v důsledku výměny média. *In vitro* rytmus v periferních orgánech vykazoval fázové zpoždění 7-11 hodin za SCN stejně jako *in vivo* (Yamazaki *et al.* 2000).

Mechanismus regulace exprese hodinových genů sice funguje v SCN a periferních orgánech na stejném principu, ale pravděpodobně zde existují jisté odlišnosti (Oishi *et al.* 2000). U *Clock/Clock* mutantní myši je v periferních orgánech hladina *mBmall* mRNA zvýšena, ale v SCN se hladina dané mRNA snižuje. Na rozdíl od SCN, které může přijímat informace o světle z retiny, periferní orgány savců

neobsahují fotoreceptory schopné zachytit světelnou informaci. Jsou tedy závislé na SCN, které jim předává informaci o vnějším světelném režimu a tím je synchronizuje (Brandstaetter 2004). Děje se tak pomocí dosud nespecifikovaných neuronálních a humorálních signálů. Mononukleární leukocyty periferních tkání potkana neobsahují neuronální synapse, přesto v nich probíhá rytmická exprese *rPer2* genu. Zdá se tedy, že humorální signály jsou na rozdíl od neuronálních signálů pro synchronizaci některých periferních orgánů nezbytné (Oishi *et al.* 1998).

Nová éra pohledu na synchronizaci oscilací v periferních orgánech začala spolu s pokusy s fibroblasty potkana. V kultuře fibroblastů potkana *in vitro* dochází k úplnému vymizení rytmicity exprese genů po 3-4 dnech. Aplikace séra k buněčné kultuře fibroblastů vyvolá rytmus v expresi genů *rPer1*, *rPer2*, *rRev-erb-a*, *rDBP* a *rTEF* i bez přítomnosti SCN. Rytmus přetrvává nejméně 3 cykly (dny) s průměrnou délkou periody 22,5 hodiny. Každý z genů je však exprimován v jiné fázi. Potenciální inhibitor genové exprese cytozin  $\beta$ -D arabinofuranosid (Ara-C) nemá na sérovým šokem indukovanou genovou expresi vliv. Sérový šok stimuluje expresi okamžitých časných genů *c-Fos* a *rPer* podobnou světlem indukované expresi genů v SCN. Spouštěcí signální dráha se tedy zdá být podobná v neuronech SCN i v buňkách stimulovaných sérovým šokem. Všechny tyto výsledky naznačovaly, že periferní orgány sice mají své vlastní oscilátory, ale pro udržení oscilací je nutné, aby byly synchronizovány centrálními hodinami v SCN (Balsalobre *et al.* 1998). Později se zjistilo, že sérovým šokem indukovaná exprese genů *rPer1* a *rPer2* v kultuře fibroblastů je pravděpodobně aktivována přímou signální dráhou zahrnující cyklický adenosinmonofosfát (cAMP), protein kinázu C (PKC), vápenaté ionty ( $\text{Ca}^{2+}$ ), tyrozin kinázové receptory (RTKs) a glukokortikoidní hormony. Zdálo se tedy, že SCN synchronizuje periferní orgány hlavně prostřednictvím humorálních signálů (Balsalobre *et al.* 2000).

Odlišné výsledky než všechny předešlé práce získala v roce 2004 pracovní skupina Yoo *et al.*, když pro sledování exprese genů v kulturách buněk periferních orgánů myši použila PERIOD2::LUCIFERÁZA (PER2::LUC) fúzní protein. Ukázalo se, že SCN i periferní orgány např. plíce, játra, ledviny a tkáň ocásku jsou schopny rytmicky oscilovat po dobu více jak 20 dnů. Po několika cyklech však dochází ke snižování amplitudy rytmů pravděpodobně v důsledku vyčerpání zásob živin a luciferinu. Výměnou média lze amplitudu rytmů opět zvýšit. *In vitro* dosahovala hladina exprese PER2::LUC v SCN maxima ve stejnou dobu jako *in vivo*, v CT12.

Zároveň všechny periferní orgány vykazovaly jasné fázové zpoždění vůči SCN stejně jako v živém organismu. Jednotlivé periferní orgány vykazovaly tkáňově specifické rozdíly v délce periody a fázi rytmu. Překvapivě u myši, kterým byla provedena léze SCN, nedochází v periferních orgánech ke ztrátě rytmicity. Dochází pouze k vnitřní desynchronizaci buněčných oscilátorů v jednotlivých tkáních. Periferní orgány tedy můžeme považovat za tkáňově specifické a také za schopné tvořit rytmické oscilace i bez přítomnosti SCN. Úkolem SCN je synchronizovat periferní orgány, jelikož v jeho nepřítomnosti dochází k desynchronizaci jednotlivých tkáňových oscilátorů (Yoo *et al.* 2004).

### **2.4.1. Synchronizace periferních orgánů změnou světelných podmínek**

Vnější světelný režim ovlivňuje nejen genovou expresi v SCN, ale i v periferních orgánech. Při fázovém posunutí světelného režimu (např. při přeletu přes více časových pásem) dochází k synchronizaci SCN téměř okamžitě, mnohem rychleji než v periferních orgánech. Pracovní skupina Yamazaki *et al.* vystavila potkany 6 hodinovému fázovému zpoždění a poté sledovala rytmickou expresi genů v SCN, játrech, plicích a kosterních svalech. SCN bylo synchronizováno již po 1. cyklu (dnu) nového světelného režimu. U periferních orgánů se fázovému zpoždění přizpůsobovala každá z tkání odlišným způsobem. Všem ale synchronizace trvala delší dobu než SCN. V některých případech, např. v kosterním svalu, posun světelného režimu dokonce na několik cyklů zcela potlačil rytmickou expresi genů v periferních orgánech. Plíce a kosterní sval byly po 1. cyklu posunuty o 4 hodiny. Po 6. cyklu byly tkáně posunuty o 6 hodin, byly tedy synchronizovány úplně. U jater trvala synchronizace nejdéle. Po 1. cyklu u nich nedošlo k žádnému fázovému posunu. Po 6. cyklu byly posunuty o 3,5 hodiny. Po 16. cyklu byla játra stále posunuta pouze o 4 hodiny. Poté byly tkáně naopak vystaveny 6 hodinovému fázovému předběhnutí. Fázovému předběhnutí se velice složitě přizpůsobovaly plíce a kosterní sval. Po 1. cyklu byla většina tkáňových kultur kosterního svalu a plic arytmiická. Kosterní svaly i plíce byly kompletně synchronizovány po 6. cyklu. Naproti tomu žádná z tkáňových kultur jater nereagovala na fázové předběhnutí ztrátou rytmicity. Po 1. cyklu byla játra předběhnuta o 2 hodiny. Po 6. cyklu byla játra synchronizována o celých 6 hodin. Pokus

s 9 hodinovým fázovým předběhnutím a zpožděním přinesl obdobné výsledky. SCN se tedy přizpůsobuje změnám způsobeným fázovým posunem mnohem rychleji než všechny zkoumané periferní orgány. Tyto výsledky podporují hypotézu, že centrální pacemaker v SCN funguje jako synchronizátor periferních orgánů. *In vivo* periferní orgány dostávají specifické humorální a neuronální signály z SCN, pomocí kterých jsou udržovány pod specifickou fázovou kontrolou (Yamazaki *et al.* 2000). Jelikož periferní orgány savců neobsahují fotoreceptory, úkolem SCN je synchronizovat je s vnějším světelným režimem (Reppert et Weaver 2001).

#### **2.4.2. Synchronizace periferních orgánů příjmem potravy**

Kromě vnějšího světelného režimu hraje důležitou roli při synchronizaci periferních orgánů příjem potravy. Podobně jako u světelné synchronizace, probíhá synchronizace pomocí doby příjmu potravy různě rychle v jednotlivých periferních tkáních. Příjem potravy je pro periferní oscilátory nejdůležitějším synchronizátorem (Schibler *et al.* 2003).

Noční živočichové jako např. myš nebo potkan přijímají potravu během subjektivní noci. Pokud těmto živočichům umožníme přístup k potravě pouze po několik hodin během subjektivního dne, jedná se o tzv. „restricted feeding“ (RF). U těchto živočichů můžeme pozorovat převrácení rytmu v expresi hodinových genů (Damiola *et al.* 2000). Tento fázový posun se však týká pouze periferních orgánů, RF nemá žádný vliv na změnu fáze exprese genů v SCN (Hara *et al.* 2001). RF ovlivňuje fázi rytmu v expresi hodinových genů o 6-12 hodin v periferních orgánech jako jsou játra, ledviny, srdce a slinivka v LD i DD světelném režimu. Z toho vyplývá, že metabolické změny v důsledku příjmu potravy mohou vést k odpáření periferních oscilátorů od SCN. Organismy vyžadují několik dní k přizpůsobení se novému potravnímu režimu. Náhlé změně v potravním režimu se nejrychleji přizpůsobují játra. Po 6-7 dnech jsou se změněnými potravními podmínkami synchronizovány všechny tkáně (Damiola *et al.* 2000). K fázovému předběhnutí periferních oscilátorů dochází i u myši, kterým byla provedena léze SCN. U myši podrobených lézi SCN můžeme také pozorovat tzv. anticipační chování, které předchází přijímání potravy (Stokkan *et al.* 2001). Projevy anticipačního chování jsou zvýšení pohybové aktivity, zvýšení tělesné teploty, zvýšení hladiny kortikosteronu, snížení hladiny glukagonu v krevní plazmě, zvýšení hladiny ketonových látek a volných mastných kyselin několik hodin před

začátkem příjmu potravy (Hara *et al.* 2001). Nejnovější výzkumy ukazují, že dorzomediální hypothalamické jádro (DMH) hraje významnou roli při synchronizaci periferních orgánů pomocí příjmu potravy. Při provedení léze DMH, dochází k vymizení projevů anticipačního chování. RF tedy pravděpodobně způsobuje změnu fáze exprese genů v periferních orgánech skrze změnu rytmické aktivity v DMH (Gooley *et al.* 2006). V DMH by se tedy mohl nacházet přídatný, příjmem potravy synchronizovatelný oscilátor (food-entrainable oscillator, FEO) (Landry *et al.* 2006). Zároveň nedojde v játrech k fázovému posunu způsobeném změnou LD režimu pokud je organismus držen v RF podmínkách a změna je provedena během noci. Naproti tomu SCN reaguje na změnu LD světelného režimu fázovým posunem exprese genů. Předpokládá se tedy, že existují dva biologické oscilátory, světlem synchronizovatelný oscilátor uložený v SCN a příjmem potravy synchronizovatelný oscilátor, jehož umístění a způsob fungování nebyly doposud prokázány (Hara *et al.* 2001). RF ovlivňuje v játrech nejen expresi hodinových genů (*Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1*, *Rev-erb-α*), ale také expresi hodinami řízených genů (*Dbp*) a expresi genů, které kódují enzymy a regulační proteiny účastníci se zpracování jídla (fosfoenolpyruvát karboxykináza, glykogen syntáza, glykogen fosforyláza), syntézy hemu (aminolevulinát syntáza), detoxifikace (cytochrom P450 enzym) a syntézy žlučových kyselin (cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxyláza). V játrech je hlavní funkcí oscilátoru řízení absorpční a postabsorpční fáze metabolických pochodů při zpracování potravy (Damiola *et al.* 2000, Panda *et al.* 2002).

Příjem potravy poskytuje pravidelně se zvyšující hladinu cirkulujících živin, které mohou působit jako signály pro genovou expresi. Např., zvýšená hladina glukózy v kultuře buněk fibroblastů potkana spustí expresi hodinových genů. Také inzulin je schopný indukovat expresi hodinových genů. Změny některých metabolických parametrů v závislosti na příjmu potravy tedy mohou mít vliv na synchronizaci periferních orgánů (Hirota *et al.* 2002).

Jak již bylo zmíněno dříve, transkripce hodinových genů je indukována navázáním heterodimeru CLOCK/NPAS2-BMAL1 do E-boxu jejich promotorů. Zdá se, že efektivitu interakce heterodimeru s příslušným DNA elementem pozitivně ovlivňuje přítomnost redukovaných forem nikotinamid adenin dinukleotidů (NADH, NADPH). Naopak oxidované formy NAD<sup>+</sup> a NADP<sup>+</sup> účinnost interakce snižují. Hladina NAD<sup>+</sup>, NADP<sup>+</sup>/NADH, NADPH závisí na metabolickém stavu buňky, konkrétně na redukci pyruvátu na laktát. Dočasná represe exprese hodinových genů může mít za následek



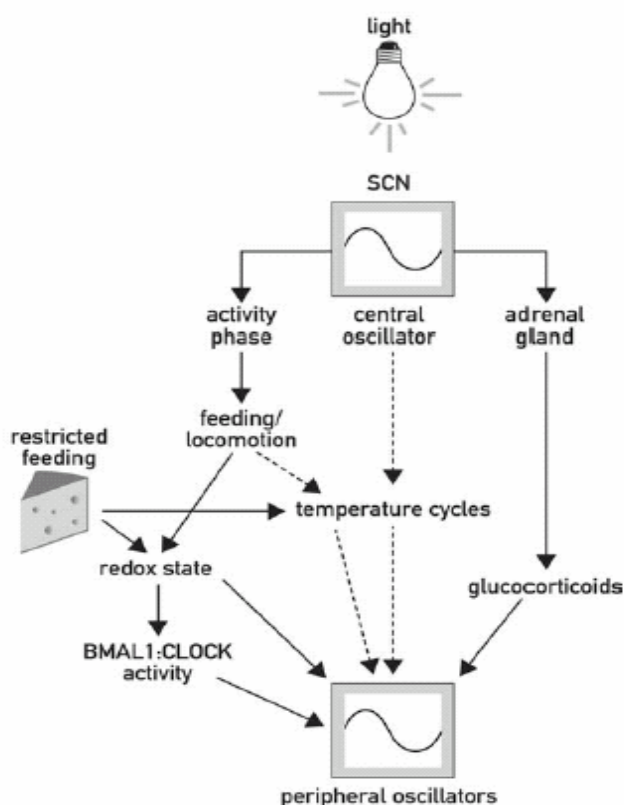
fázové posunutí oscilátorů v periferních orgánech (Rutter *et al.* 2001, Schibler *et al.* 2003).

CLOCK protein není esenciální pro změnu fáze exprese genů v periferních orgánech při RF režimu. K fázovému posunu exprese *mPer2* a *mBmal1* genů při RF dochází i u *Clock/Clock* mutantní myši (Oishi *et al.* 2002). Také na příjmu potravy závislá sekrece hormonů pravděpodobně ovlivňuje fázové nastavení periferních oscilátorů (Stokkan *et al.* 2001). Ještě před samotným příjmem potravy jsou v trávicím traktu uvolňovány gastrointestinální hormony, které jsou zodpovědné za spuštění MAP kinázové dráhy. Výsledkem je fosforylace transkripčního faktoru CREB, jeho navázání do CRE elementu v promotorech genů a následná indukce genové exprese (Schibler *et al.* 2003).

Synchronizace periferních orgánů se účastní mnoho humorálních faktorů. Patří mezi ně i již dříve zmíněné glukokortikoidní hormony. Aplikace glukokortikoidů nebo jejich analogu dexametazonu (Dex) stimuluje expresi *rPer* genů v buněčné kultuře fibroblastů potkana. Naproti tomu rytmická exprese *rPer* genů není ovlivněna bloádou glukokortikoidních receptorů. Exprese těchto genů probíhá také v periferních tkáních, které glukokortikoidní receptory neexprimují. Z toho vyplývá, že glukokortikoidy se podílejí spíše na modulaci exprese hodinových genů než na její tvorbě (Balsalobre *et al.* 2000). U nočních zvířat dochází k fázovému posunu exprese hodinových genů a hodinami kontrolovaných genů v periferních orgánech pomalu, pokud je doba příjmu potravy přesunuta ze subjektivní noci do subjektivního dne. Naopak fázový posun probíhá rychle při navrácení doby příjmu potravy zpět do subjektivní noci. Překvapivě jsou za pomalou změnu fázového posunu v játrech a v ledvinách zřejmě zodpovědné glukokortikoidy. V tkáních bez přítomnosti glukokortikoidních hormonů nebo glukokortikoidních receptorů probíhá fázový posun rychle. Obrácená fáze v expresi hodinových genů se zde projeví během několika dnů po zavedení RF režimu. Z toho vyplývá, že glukokortikoidní hormony zpomalují fázový posun genové exprese v periferních orgánech v důsledku RF, a inhibují tak odpřažení periferních oscilátorů od centrálního pacemakeru. Glukokortikoidy též nemají vliv na fázový posun oscilátorů v játrech a ledvinách pokud je přístup k potravě neomezený (*ad libitum*) nebo přesunutý do subjektivní noci. Denní hladina glukokortikoidních hormonů v těle je regulována SCN pomocí hypotalamo-hypofyzární-nadledvinkové osy. SCN tak může regulovat rychlost odpřažení periferních orgánů v důsledku změny doby příjmu potravy. U denních i nočních živočichů dosahují glukokortikoidy maximální hladiny před začátkem

doby aktivity (Le Minh *et al.* 2001). Bylo zjištěno, že glukokortikoidy regulují expresi transkripčního faktoru *Rev-erb-α* v játrech. 6 hodin po aplikaci dexametazonu byl u potkanů pozorován 70% pokles hladiny *rRev-erb-α* mRNA. Exprese genu *rRev-erb-α* je tedy kontrolována cirkadiálními hodinami i hladinou glukokortikoidů v játrech. Regulace pravděpodobně probíhá skrze navázání glukokortikoidních hormonů do GRE (non-glucocorticoid responsive element) elementu v P1 promotoru *rRev-erb-α* genu (Torra *et al.* 2000).

Synchronizace periferních orgánů může být zprostředkována také nervovými spoji mezi centrálním oscilátorem a periferními orgány. Nervová spojení jsou tvořena sympatickými a parasympatickými vlákny autonomního nervového systému pomocí preautonomních neuronů paraventriculárního jádra hypotalamu (PVN) a dalších hypotalamických struktur (Kalsbeek *et al.* 2004, Shibata 2004). Neuropeptidy (např. GABA, AVP, noradrenalin) produkované SCN předávají výstupní signály hypotalamickým strukturám, které ovlivňují fungování mnohých fyziologických procesů v periferních orgánech (Buijs *et al.* 2003).



**Obr. 4:** Signály synchronizující periferní oscilátory. Převzato z Stratmann et Schibler 2006.

### 2.4.3. Cirkadiánní hodiny v gastrointestinálním traktu

Cirkadiánní rytmy hrají významnou roli v regulaci trávicího systému mnoha organismů. Od roku 1940 bylo v trávicím systému hlodavců a savců popsáno mnoho cirkadiánních rytmů, např. rytmus v syntéze DNA, rytmická exprese cyklínů a karbohydrázová aktivita (Scheving *et al.* 1983, Scheving 2000). Gastrointestinální trakt (GIT) vykazuje každodenní rytmy v mnoha fyziologických procesech jako jsou peristaltika střev, trávení, vstřebávání, aktivita mukózních enzymů a transportérů a buněčná proliferace (Scheving 2000). Tyto rytmy jsou řízeny především příjmem potravy, ale mohou přetrvávat i během omezení příjmu potravy, tedy nezávisle, což ukazuje na existenci endogenního oscilátoru (Scheving *et al.* 1984). Buněčná proliferace, migrace, diferenciace, apoptóza atd. probíhá pouze v určité době během dne v různých částech trávicí soustavy (např. žaludku, střevech, játrech a slezině) a v různých typech buněk jako výsledek specificky časově omezené genové exprese a produkce proteinů. Bylo objeveno, že hodinové geny jsou zodpovědné za udržování cirkadiánních oscilací v trávicím systému stejně jako i v dalších periferních orgánech (Scheving 2000, Bjarnason *et al.* 2001). Přítomnost hodinových genů byla prokázána v lidských střevních epitelálních buňkách a v sliznici úst (Pardini *et al.* 2005).

### 2.4.4. Kontrola cyklu buněčného dělení v gastrointestinálním traktu

U savců probíhá buněčné dělení pouze v určité specifické době během 24 hodin. Cyklus buněčného dělení eukaryotních buněk se skládá ze čtyř fází: G1-fáze, S-fáze, G2-fáze, M-fáze. Buněčný cyklus je řízen změnami v aktivitě specifických enzymů cyklín dependentních kináz (cyclin-dependent kinases, CDC). Tyto kinázy jsou aktivovány cykliny a posttranskripčně modifikovány mnohými kinázami a fosfatázami. Přechod z G1-fáze do S-fáze buněčného cyklu je regulován cykliny A, D, E a několika kinázami, např. *p21* a *p16*. Přechod z G2-fáze do M-fáze buněčného dělení je řízen komplexem CDC2-cyklín B1. Tento komplex je inaktivován WEE1 kinázou a aktivován CDC25 fosfatázou (Lodish *et al.* 2004).

Pracovní skupina Matsuo *et al.* provedla u myši částečnou hepatektomii (chirurgické odstranění 2/3 jaterní tkáně) a poté sledovala časovou koordinaci jejich regenerace. Zjistila, že regenerující jaterní buňky vstupují do S-fáze buněčného cyklu

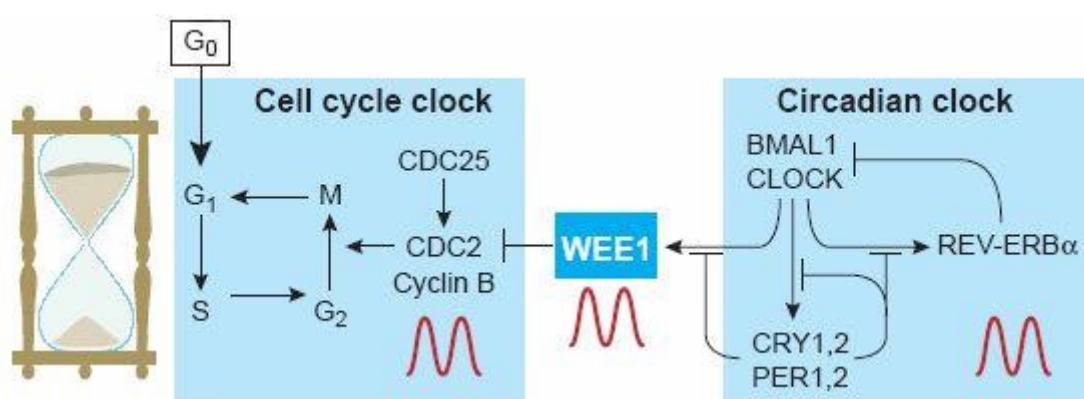
zhruba po 36 hodinách od provedení operace nezávisle na tom, ve které části dne byl zákrok proveden. Zatímco k přechodu z G2-fáze do M-fáze buněčného dělení docházelo vždy ve stejnou denní dobu, bez ohledu na to, kdy byla hepatoektomie provedena. Tyto výsledky poukazovaly na řízení cyklu buněčného dělení cirkadiánními hodinami (Matsuo *et al.* 2003). Cyklus buněčného dělení je kontrolován cirkadiánními hodinami, které řídí vstup buňky do mitotické fáze (M-fáze) buněčného cyklu skrze regulaci exprese genu *Wee1* (Schibler 2003).

1,2 kpb dlouhá 5' oblast *mWee1* genu obsahuje tři E-box elementy, do kterých se váže heterodimer mCLOCK-mBMAL1 a indukuje transkripci genu. Exprese genu *mWee1* je negativně regulována mPER a mCRY proteiny. Pokud jsou mutovány všechny tři E-box sekvence, dochází k prudkému snížení exprese genu, což naznačuje, že *mWee1* je pod přímou kontrolou cirkadiánního oscilátoru. Hladina *mWee1* mRNA dosahuje maxima stejně jako gen *mPer1* během světlé části dne, konkrétně v CT8 (Matsuo *et al.* 2003). WEE1 protein kináza negativně reguluje aktivitu CDC2-cyklin B1 komplexu, který je důležitým elementem pro přechod buňky z G2-fáze do M-fáze buněčného cyklu. Při vysoké hladině WEE1 během světlé části dne, WEE1 kináza fosoryluje CDC2 kinázu na tyrozinu 15, a tím ji inaktivuje. Při nízké hladině WEE1, CDC25 protein fosfatáza odstraňuje inhibiční fosfát z tyrozinu 15, a tím aktivuje komplex CDC2-cyklin B1, který indukuje vstup buňky do M-fáze buněčného cyklu. *Wee1* tedy potlačuje vstup buňky do M-fáze buněčného cyklu během světlé části dne a posunuje ho do tmavé části dne (Schibler 2003) (obr. 5).

U *Cry1* a *Cry2* mutantní myši byla detekována konstantní vysoká hladina mWEE1, která způsobí trvalou inhibici CDC2-cyklin B1 komplexu a zpomalení cyklu buněčného dělení (Schibler 2003). Další propojení mezi cirkadiánními hodinami a buněčnou proliferací bylo prokázáno pomocí pokusů s myšimi *Per2* mutanty, které projevovaly vyšší náchylnost k výskytu rakoviny v důsledku zvýšené citlivosti k radiaci, následnému poškození DNA a snížení účinnosti kontrolované buněčné smrti (apoptózy). U 15 % *mPer2* mutantů byl zjištěn výskyt maligního lymfomu. Tento maligní lymfom vykazuje nízkou hladinu cytochromu c a p-53 molekul, které jsou klíčové pro spuštění apoptózy buňky. U *Per2* mutantní myši byla také zjištěna zvýšená exprese potencionárního onkogenu *c-Myc*. Ten obsahuje ve svém P1 promotoru E-box sekvenci a je kontrolován přímo cirkadiánními hodinami. *c-Myc* obsahuje pro transkripční faktory charakteristický bHLH DNA vazebný motiv, pomocí něhož se váže na promotory cílových genů. Cirkadiánní systém má vliv na rozvoj nádoru skrze

regulaci exprese hodinami kontrolovaných genů, které jsou zapojeny v signálních cestách řídících opravy poškozené DNA, indukci apoptózy, kontrolu růstu buněk (Fu *et al.* 2002). Klinické studie podporují hypotézu, že narušení cirkadiánního systému zvyšuje pravděpodobnost výskytu nádorů i u člověka. Ukázalo se, že gen *Per1* je důležitou spojkou mezi cirkadiánními rytmy a buněčným dělením. Nadměrná exprese tohoto genu vede k zastavení buněčného cyklu, opravám DNA, indukci apoptózy a snížení růstu lidských nádorových buněk. Naopak, snížená exprese *Per1* genu vede k potlačení apoptózy a k rozvoji nádorových buněk (Gery *et al.* 2006).

Cirkadiánní hodiny tedy řídí nejen rytmické děje v organismech na behaviorální a metabolické úrovni, ale jsou také zapojeny do kontroly cyklu buněčného dělení a do regulace odpovědi buňky na poškození genetického materiálu a rozvoje nádorových buněk. Porozumění tomuto složitému molekulárnímu systému má veliký význam pro budoucí rozvoj farmakologických studií, které mohou otevřít nové obzory v terapii nádorových onemocnění.



**Obr. 5:** Propojení cirkadiánních hodin a cyklu buněčného dělení. Převzato z Schibler 2003

## 2.5. Cirkadiánní systém během ontogeneze

Během ontogeneze se molekulární mechanismus odpovědný za generování cirkadiánních rytmtů vyvíjí postupně v průběhu prenatálního i postnatálního období života. V prenatálním a raném postnatálním období jsou vyvíjející se cirkadiánní hodiny synchronizovány výhradně pomocí mateřských signálů. Synchronizace pomocí vnějšího

světelného režimu se rozvíjí postupně později během postnatálního vývoje, kdy vystřídá mateřskou synchronizaci (Sumová *et al.* 2006). Ontogeneze cirkadiálních rytmů probíhá odlišně v SCN a v periferních orgánech.

SCN je u 14- až 17-denních embryí potkana tvořeno shluky periventrikulárních buněk. Neurogeneze SCN je dokončena již 18. den embryonálního vývoje. Během prenatalního období jsou neurony SCN propojeny pouze několika synapsemi a synaptogeneze se rychle rozvíjí mezi 4. a 10. dnem postnatálního vývoje (Moore 1991). Rytmus v expresi hodinových genů *Per1* a *Per2* se v SCN objevuje poprvé u 20-denních embryí (Ohta *et al.* 2002, 2003). Amplituda rytmů *Per1* a *Per2* se zvyšuje až do 10. dne postnatálního vývoje (Sládek *et al.* 2004). Rytmiická exprese *Bmal1* je poprvé detekovatelná u jednodenních mláďat a *Cry1* dokonce ještě později. SCN začíná generovat výstupní rytmy v produkci *Avp* heteronukleární RNA přibližně v době narození (Kováčiková *et al.* 2006). Během ontogeneze se tedy s vývojem SCN paralelně rozvíjí i rytmus v expresi hodinových genů. U plodu jsou SCN synchronizována signály pravidelně dodávanými matkou. Synchronizace pomocí humorálních faktorů se pravděpodobně účastní melatonin a dopamin indukující expresi genu *c-fos* (Weaver et Reppert 1995). Také příjem potravy a pohybová aktivita matky mohou fungovat jako synchronizační signály. Ačkoliv signální dráha umožňující světelnou synchronizaci je vyvinuta již v době narození (Leard *et al.* 1994), světelný režim se stává dominantním synchronizátorem teprve postupně během prvního týdne po narození (Weaver et Reppert 1995).

V periferních orgánech je vývoj molekulárního mechanismu odpovědného za tvorbu cirkadiálních oscilací druhově a tkáňově specifický. V srdci potkana se rytmus v expresi *rPer1*, *rBmal* a *rDbp* poprvé objevuje mezi 2. a 5. dnem po narození, zatímco exprese *rPer2* je rytmická až od 14. dne postnatálního vývoje (Sakamoto *et al.* 2002). V játrech je poprvé detekovatelný rytmus v expresi *rRev-erb-α* už u 20-denních embryí. Rytmiická exprese ostatních hodinových genů se pak vyvíjí postupně mezi 10. a 20. dnem postnatálního vývoje. Teprve 30-denní mláďata vykazují jasný cirkadiální rytmus v expresi všech hodinových genů s fází shodnou s dospělými jedinci. Fáze rytmu exprese hodinových genů se v játrech během postnatálního období života mění, pravděpodobně v důsledku změny doby příjmu potravy (Sládek *et al.* 2004, 2007). Během postnatální ontogeneze jsou tedy periferní orgány mláďat synchronizovány nejen signály z vyvíjejících se SCN, ale současně také signály

od matky, jako je pravidelná péče o mláďata a jejich krmení během světlé části dne (Sakamoto *et al.* 2002).

## 3. MATERIÁL A METODIKA

### 3.1. Chov experimentálních zvířat

Jako experimentální zvířata byli používáni samci, samice a mláďata laboratorního potkana (*Rattus norvegicus*) kmene Wistar (var. Alba) (BioTest Konárovice). Věk použitých zvířat byl 20. den embryonálního vývoje až 8 týdnů. Zvířata byla krmena standardní laboratorní krmnou směsí a napájena vodou *ad libitum*. Teplota ve zvířinci byla udržována konstantně na 23°C, denní osvětlení bylo zajištěno zářivkami Tesla 40 W. Intenzita osvětlení na úrovni chovných klecí byla 150-250 luxů. Definovaný světelný režim LD 12:12 byl nastaven a řízen automatickým hodinovým spínačem. V den pokusu byl zvířatům nastaven režim stálé tmy, zvířata byla poté zabíjena průběžně v denních a nočních hodinách.

### 3.2. Uspořádání jednotlivých pokusů

#### 3.2.1. Detekce exprese hodinových genů a genu *rWeel* v jednotlivých částech trávicího systému (dvanáctník, lačník, kyčelník, tlusté střevo) potkana během 12 hodin a 24 hodin

Dospělí samci byli chováni na světelném režimu LD 12:12 s přístupem k potravě i vodě *ad libitum*. V den pokusu byla zvířata vypuštěna do stálé tmy. Odběry byly prováděny ve 4-hodinových intervalech během 24 hodin (tj. CT0-CT24), respektive v 1 hodinových intervalech během 12 hodin (tj. CT0-CT12) (3 zvířata/1 časový bod). Anestezie zvířat byla provedena intraperitoneální injekcí Thiopentalu (cca 1-1,5 ml/potkan). Poté byli potkani dekapitováni a byl proveden odběr dvanáctníku, lačníku, kyčelníku a tlustého střeva. Vzorky epiteliálních buněk mukózní sliznice, získané seškrábnutím lumen střeva pomocí krycího sklíčka, byly uchovávány v RNAlateru v -80°C až do zpracování.



### **3.2.2. Detekce proteinů rBMAL1 a rPER1 v kolorektální části tlustého střeva potkana během 24 hodin**

Dospělí samci byli chováni na světelném režimu LD 12:12 s přístupem k potravě i vodě *ad libitum*. V den pokusu byla zvířata vypuštěna do stálé tmy. Odběry byly prováděny v 2 hodinových intervalech během 24 hodin (3 zvířata/1 časový bod). Anestezie zvířat byla provedena intraperitoneální injekcí Thiopentalu (cca 1-1,5 ml/potkan). Poté byli potkani dekapitováni a byl proveden odběr cca 1x1 cm velké tkáně kolorektální části tlustého střeva. Vzorky byly uchovávány v cryomountových bločcích při teplotě -80°C až do zpracování.

### **3.2.3. Detekce vývoje rytmické exprese hodinových genů v tlustém střevu potkana během ontogeneze**

Pro pokusy byli použiti potkani různých věkových skupin (20-denní embrya, 2-, 10-, 20-, 30-denní mláďata). Březí samice a matky s mláďaty byly chovány na světelném režimu LD 12:12 s přístupem k potravě od matky *ad libitum*. V den pokusu byly březí samice i s mláďaty vypuštěny do stálé tmy. Odběry byly prováděny ve 4-hodinových intervalech během 24 hodin (3 mláďata + 3 březí samice/1 časový bod). Anestezie březích samic byla provedena intraperitoneální injekcí Thiopentalu (cca 1-1,5 ml/potkan) a následně jim byla z těla odebrána embrya. Embrya i mláďata byla dekapitována a poté byl proveden odběr epiteliálních buněk tlustého střeva. Vzorky byly uchovávány v RNAlateru v -80°C až do zpracování.

### 3.3. Detekce mRNA hodinových genů a genu *rWeel* pomocí kvantitativní real-time RT-PCR

Kvantitativní real-time RT-PCR je v současné době převažující, široce používanou metodou pro kvantitativní detekci specifických úseků nukleových kyselin (cDNA, dsDNA). Metoda je založena na mnohonásobné amplifikaci templátového úseku nukleové kyseliny pomocí enzymu DNA polymerázy. Syntéza DNA je řízena krátkými oligonukleotidy, tzv. primery, které jsou komplementární k sekvenci na protilehlých řetězcích úseku cílového genu. K detekci množství amplifikovaných produktů se využívají specifická fluorescenční barviva a sondy (např. SYBR Green, TaqMan sondy). Narůstající fluorescence pak odpovídá vzrůstajícímu množství nukleové kyseliny ve vzorku. Na základě matematické analýzy získaných amplifikačních křivek lze poměrně přesně kvantifikovat počáteční množství templátových molekul ve vzorku.

Pro stanovení hladin mRNA hodinových genů *rPer1*, *rPer2*, *rBmall*, *rRev-erb-α*, *rClock*, *rCry1*, hodinami kontrolovaného genu *rWeel* a tzv. „housekeeping genu“ *rβ-2-mikroglobulinu (rB2M)* byly navrženy dvojice primerů: horní (forward, F) a dolní (reverze, R). Primery byly navrženy v naší laboratoři pomocí programu PrimerSelect (součást software Lasergene, DNASTar) a objednány u firmy VBC Genomics (tab. 1).

Jako referenční konstitutivně exprimovaný gen, tzv. „housekeeping gen“, byl použit *rB2M*. Jako negativní kontrola byla použita kompletní reakční směs bez cDNA. Jako vnější standard byla použita cDNA CT24a, z které byla připravena ředící řada (3x, 10x, 30x, 100x) pro jednotlivé geny. Z ředící řady standardu byla pomocí metody druhé derivace maxima sestrojena kalibrační přímka. Hodnoty koncentrací mRNA všech genů byly kvantifikovány relativně vzhledem k vnějšímu standardu. Tyto hodnoty byly poté kvantitativně vyjádřeny v poměru k *rB2M*.

Gen	Primer	Sekvence	Délka produktu
<b>rB2M</b> (GenBank, NM_012512)	F R	5'-CGCTCGGTGACCGTGATCTTCTG-3' 5'-CTGAGGTGGTGGAACCTGAGACACG-3'	156 kpb
<b>rPer1</b> (GenBank, AB002108)	F R	5'-CGCACTTCGGGAGCTCAAACTTC-3' 5'-GTCCATGGCACAGGGCTCACCC-3'	169 kpb
<b>rPer2</b> (GenBank, NM_031678)	F R	5'-CACGCAACGGGGAGTACATCACAC-3' 5'-CAAGGGAGGCTGCGAACACAT-3'	142 kpb
<b>rBmall</b> (GenBank, AB012600)	F R	5'-CAATGCGATGTCCCGGAAGTTAGA-3' 5'-TCCCTCGGTACATCCCTGAGAAAT-3'	169 kpb
<b>rRev-erb-a</b> (GenBank, NM_145775)	F R	5'-GCTGTGCGGGAGGTGGTAGAAT-3' 5'-TGTAGGTTGTGCGGCTCAGGAA-3'	175 kpb
<b>rClock</b> (GenBank, NM_021856)	F R	5'-TTCGATCACAGCCCAACTCC-3' 5'-ACCTCCGCTGTGTCATCTTCTC-3'	163 kpb
<b>rCry1</b> (GenBank, NM_198750)	F R	5'-GTGGTGGCGGAACACTGCTCTC-3' 5'-ACTCTGTGCGTCCTCTTCTCTGA-3'	152 kpb
<b>rWeel</b> (GenBank, NM_001012742)	F R	5'-ATCCCCCATGTGGTTCGTTATTCTCTG-3' 5'-ATGTATGTATCTCAAGCCCCCTGCCAACT-3'	188 kpb

Tab. 1: Sekvence použitých primerů

## **Přístroje**

- LightCycler Roche
- Flow-box BIOAIR Instruments Aura mini
- Spektrofotometr Eppendorf
- Centrifuga Sigma 3K 18
- Centrifuga Eppendorf Mini Spin plus
- Termoblok Biometra TB1
- Termoblok Grant BT3
- Vodní lázeň Julaba
- Horizontální elektroforéza OminiBio
- Vortex Genie 2 Scientific Industries

## **Chemikálie**

- RNA blue reagent (Top-Bio)
- RNAlater (Qiagen)
- Fenol (Sigma)
- Chloroform (Sigma)
- Izopropanol (Lachema)
- Agaróza (Top-Bio)
- 75% etanol (Merck)
- DEPC H<sub>2</sub>O-voda zbavena RNázové aktivity
- 100 kpb DNA Ladder (Top-Bio)
- Etidium bromid (Sigma)

## **Kity**

- ImProm-II Reverze Transcription System (Promega):
  - H<sub>2</sub>O-voda zbavena nukleáz
  - Reakční pufr
  - Směs dNTP, 10 mM
  - MgCl<sub>2</sub>, 25 mM
  - Reverzní transkriptáza (RT)
  - RNazin-inhibitor ribonukleáz, 1 µg/µl

- 1,2 kpb kanamycinová pozitivní RNA kontrola, 0,01 µg/µl
- Oligo(dT)<sub>15</sub> primer, 0,5 µg/µl
- Random primery, 0,5 µg/µl
- Upstream kontrolní primer, 15 µM
- Downstream kontrolní primer, 15 µM
  
- QuantiTect SYBR Green PCR kit (Qiagen):
  - QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix:
    - HotStart Taq DNA polymeráza
    - QuantiTect SYBR Green PCR puf
    - Směs dNTP
    - Fluorescenční barvivo SYBR Green I, ROX
  - PCR H<sub>2</sub>O-voda zbavena nukleáz

### **3.3.1. Postup**

#### **3.3.1.1. Izolace celkové RNA**

1. Homogenizace 100 mg tkáně střevního epitelu v 1 ml RNA blue reagent
2. Homogenát přelit do čisté 1,5 ml eppendorf zkumavky, centrifugace 5 minut při 12000-14000 rpm a 4°C.
3. Supernatant odebrán do čisté eppendorf zkumavky, inkubace supernatantu 5 minut při pokojové teplotě (degradace nukleoproteinových komplexů).
4. K supernatantu přidáno 200 µl chloroformu, protřepat, inkubace mléčně zbarvené směsi 10 minut při pokojové teplotě, centrifugace 15 minut při 12000-14000 rpm a 4°C.
5. Dochází ke vzniku tří fází: spodní fáze obsahuje chloroform s DNA, svrchní vodná fáze obsahuje RNA, interfáze obsahuje proteiny, odebrána svrchní vodná fáze s RNA a přenesena do čisté eppendorf zkumavky.
6. K vodné fázi přidáno 500 µl izopropanolu, protřepat, inkubace 10 minut při pokojové teplotě, centrifugace 10 minut při 12000-14000 rpm a 4°C.
7. Během centrifugace se na dně eppendorf zkumavky vytvoří RNA peleta, odebrán supernatant, RNA peleta promyta 1 ml 75% etanolu, centrifugace 5 minut při 12000-14000 rpm a 4°C.

8. Odstranění supernatantu, RNA peleta nechána vyschnout 10-15 minut při pokojové teplotě.
9. Peleta rozpuštěna v 50  $\mu$ l DEPC H<sub>2</sub>O.
10. Množství a čistota celkové RNA stanoveno pomocí spektrofotometru, kvalita celkové RNA stanovena na 1% agarózové gelové elektroforéze.
11. Izolovaná celková RNA skladována v -80°C.

### 3.3.1.2. Syntéza cDNA

1. Použita celková izolovaná RNA naředěná na koncentraci 250  $\mu$ g/ml
2. Reakční směs pro reverzní transkripci (15  $\mu$ l) :
 

H <sub>2</sub> O	4,5 $\mu$ l
Reakční pufr	4 $\mu$ l
Mg <sup>2+</sup>	4 $\mu$ l
dNTP	1 $\mu$ l
RNazin	0,5 $\mu$ l
RT	1 $\mu$ l
3. K 4  $\mu$ l RNA přidán 1  $\mu$ l random primerů, inkubace 5 minut při 70°C v termobloku, 5 minut chlazení na ledu, centrifugace.
4. K 5  $\mu$ l RNA s random primery přidáno 15  $\mu$ l reakční směsi pro reverzní transkripci, inkubace 5 minut při pokojové teplotě.
5. Inkubace 60 minut ve vodní lázni nebo v termobloku při 42°C
6. Poté inkubace 15 minut v termobloku při 70°C.
7. cDNA naředěna v poměru 1:2 ddH<sub>2</sub>O, uchovávána v -20°C.

### 3.3.1.3. Kvantitativní real-time RT-PCR

1. Do PCR kapilár napipetována reakční směs pro RT-PCR reakci (20  $\mu$ l):
 

SYBR Green Master Mix	10 $\mu$ l
PCR H <sub>2</sub> O	6 $\mu$ l
*Horní primer, 10 mM	1 $\mu$ l
*Dolní primer, 10 mM	1 $\mu$ l
cDNA	2 $\mu$ l
2. Centrifugace přibližně 10 vteřin při 2 rpm.

### 3. Amplifikační protokol (tab. 2).

\* Teplota reasociace jednotlivých primerů s templátovou nukleovou kyselinou:

*rB2M*            60°C

*rPer1*            62°C

*rPer2*            62°C

*rBmall*           55°C

*rRev-erb- $\alpha$*    56°C

*rClock*           60°C

*rCry1*            58°C

	Počáteční denaturace	Amplifikace			Melting (křivka tání)			Ochlazení
		Denaturace	Reasociace	Extenze				
<b>Teplota (°C)</b>	95	94	55-62	72	95	62	95	42
<b>Čas (s)</b>	900	15	20	10	0	30	0	30
<b>Nárůst/pokles (°C/s)</b>	20	20	20	20	20	20	0,1	20
<b>Počet cyklů</b>	1	50			1			1
<b>Fluorescence</b>		Měřena při každém cyklu					Měřena kontinuálně	

**Tab. 2:** Amplifikační protokol



### **3.3.2. Hodnocení kvantifikace a analýza dat real-time RT-PCR**

Získané hodnoty koncentrací mRNA všech genů byly relativně kvantifikovány vzhledem k vnějšímu standardu. Tato data byla poté vyjádřena v poměru k tzv. „housekeeping genu“. Tzv. „crossing points“ byly určeny pomocí matematické metody maxima druhé derivace. Pro ověření přítomnosti nespecifických produktů (primer-dimery) byla provedena analýza křivky tání.

### **3.4. Detekce rPER1 a rBMAL1 proteinů pomocí metody imunocytochemie**

Imunocytochemie je metoda používaná pro detekci proteinů v buňkách. Princip je založen na specifické reakci antigenu s protilátkou. Používají se protilátky monoklonální nebo polyklonální. Monoklonální protilátky jsou schopny rozeznat jediný konkrétní epitop antigenu. Zatímco polyklonální protilátky se vážou na různé epitopy antigenu a jsou tedy méně specifické. V naší laboratoři používáme nepřímou dvoustupňovou metodu pro stanovení proteinů, která využívá vazby antigen-primární protilátka-sekundární protilátka značená fluorochromem. Dále je používána nepřímá čtyřstupňová metoda pro zesílení hledaného signálu. Tato metoda využívá vazby antigen-primární protilátka-sekundární protilátka s navázaným biotinem-avidin-biotin-peroxidáza. Enzym křenuvová peroxidáza reaguje s dodaným substrátem diaminobenzidinem (DAB) za vzniku barevného pruduktu-signálu.

#### **3.4.1. Imunocytochemie s využitím diaminobenzidinu (DAB)**

##### **Přístroje**

- Cryo-cut Leica CM 1850
- Mikroskop Olympus AX70 s připojenou CCD kamerou Sony a počítačem
- Mikroskop Olympus CX40
- pH metr Denver Instruments BASIC

##### **Chemikálie**

- Dihydrogenfosforečnan sodný, dihydrát ( $M_r = 156,01$ ) (Lachema)
- Hydrogenfosforečnan sodný, dodekahydrát ( $M_r = 358,14$ ) (Penta)
- Hydrogenfosforečnan sodný, bezvodý ( $M_r = 141,96$ ) (Sigma)
- Sušené mléko (Mili)
- Paraformaldehyd (Fluka)
- Peroxid vodíku ( $H_2O_2$ ) (Chemické závody Sokolov)

- Hovězí sérový albumin (BSA) (Sigma)
- Chlorid sodný (Sigma)
- Chlorid draselný (Lachema)
- Azid sodný (Lachema)
- Diaminobenzidin (DAB) (Sigma)
- Etanol (Tamda)
- Xylen (Lachema)
- Triton X-100 (Sigma)
- Histologický balzám DPX (Fluka)
- Primární anti-rPER1 polyklonální protilátka (vyrobena v Massachusetts General Hospital, darována dr. Reppertem), antigenní specifita namířena proti 6-21 aminokyselinové sekvenci rPER1, zásobní roztok ředěný 1:10
- Primární anti-rBMAL1 polyklonální protilátka (Sigma, darována dr. O'Neillem), antigenní specifita namířena proti 15 aminokyselin dlouhému zbytku karboxylového konce rBMAL1, zásobní roztok ředěný 1:1
- Avidin/ biotin blokovací kit (Vector Laboratories):
  - Avidin
  - Biotin
- Vectastain Elite ABC kit (Vector Laboratories):
  - Normální kozí sérum (NGS)
  - Sekundární protilátka s navázaným biotinem
  - Avidin
  - Biotin s navázanou křenovou peroxidázou H

## Roztoky

Množství připravených roztoků odpovídá spotřebě při zpracování 91 skel (39 skel pro detekci rPER1, 39 skel pro detekci rBMAL1, 13 skel jako negativní kontrola). Do jedné kyvety se vejde 5 skel a 10 ml roztoku.

- 0,01 M PBS (fyziologický roztok pufovaný fosfáty)  
 10,74 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  + 4,68 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  + 24 g NaCl + 0,6 g KCl  
 Rozpuštěno ve 3 litrech ddH<sub>2</sub>O, upraveno na pH= 7,2, přefiltrováno
- 0,2 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$

31,2 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  rozpuštěno v 1 litru dd $\text{H}_2\text{O}$

- 0,2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

71,6 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  rozpuštěno v 1 litru dd $\text{H}_2\text{O}$

- 4% PFA (paraformaldehyd)

810 ml 0,2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  + 190 ml 0,2 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  + 80 g paraformaldehydu

Rozpuštěno při 65°C, doplněno do 1 litru dd $\text{H}_2\text{O}$ , přefiltrováno, upraveno na pH=7,2, používat vždy čerstvě připravený roztok

- 3% roztok  $\text{H}_2\text{O}_2$  (peroxidu vodíku)

19 ml 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  + 190 ml 0,01 M PBS, používat vždy čerstvě připravený roztok

- Inkubační pufr (IP): 1% BSA/ 0,3% Triton X-100/ 0,01 M PBS

10 g BSA + 2,8 ml Triton X-100 + 1000 ml 0,01 M PBS, používat vždy čerstvě připravený roztok

- Promývací pufr (PP): 0,3% BSA/ 0,3% Triton X-100/ 0,01 M PBS

10 g BSA + 2,8 ml Triton X-100 + 3000 ml 0,01 M PBS, používat vždy čerstvě připravený roztok

- 2% roztok NGS (normální kozí sérum)

3,8 ml NGS + 190 ml IP, používat vždy čerstvě připravený roztok

- 5% roztok sušeného mléka

9,5 g sušeného mléka + 190 ml IP, používat vždy čerstvě připravený roztok

- Roztok avidinu

38 ml avidinu D + 190 ml IP, používat vždy čerstvě připravený roztok

- Roztok biotinu

38 ml biotinu + 190 ml IP, používat vždy čerstvě připravený roztok

- Roztok primární protilátky anti-rPER1 1:8000

9,75  $\mu\text{l}$  anti-rPER1 (zásobní roztok ředěný 1:10) + 7800  $\mu\text{l}$  IP, na 1 sklo nanášet 200  $\mu\text{l}$  roztoku, vždy čerstvě připravený roztok

- Roztok primární protilátky anti-rBMAL1 1:5000

1,56  $\mu\text{l}$  anti-rBMAL1 (zásobní roztok ředěný 1:1) + 7800  $\mu\text{l}$  IP, na 1 sklo nanášet 200  $\mu\text{l}$  roztoku, vždy čerstvě připravený roztok

- Roztok sekundární protilátky s navázaným biotinem 1:600

30,3  $\mu$ l sekundární protilátky s navázaným biotinem + 18,2 ml IP, na 1 sklo nanášet 200  $\mu$ l roztoku, vždy čerstvě připravený roztok

- Roztok avidin/ biotin/ peroxidáza (ABC)  
45,5  $\mu$ l avidinu + 45,5  $\mu$ l biotinu s navázanou křenovou peroxidázou + 18,2 ml PP, na 1 sklo nanášet 200  $\mu$ l roztoku, vždy čerstvý roztok připravený 30 minut předem kvůli vytvoření komplexu avidin/biotin
- Roztok diaminobenzidinu (DAB)  
4 tablety DAB (4 x 10mg) + 28  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 80 ml 0,01M PBS, vždy čerstvě připravený roztok

### 3.4.1.1. Postup

Není-li uvedeno jinak, celý postup probíhá při pokojové teplotě.

1. Příprava řezů z tkáně kolorektální části tlustého střeva uchovávané v cryomountových bločcích:  
na cryo-cutu Leica CM 1850 byly připraveny 12  $\mu$ m řezy z dané tkáně při teplotě -25°C, které byly nanесeny na podložní skla SuperFrost Plus (3 řezy z každého individuálního zvířete/1 sklo) a skladovány až do dalšího zpracování v -80°C.
2. Skla vyndat z -80°C, nechat 10-20 minut ležet na podložce při pokojové teplotě k oschnutí.
3. Fixace řezů v 4% PFA 30 minut.
4. Promytí řezů v 0,01 M PBS 3 x 5 minut.
5. Snížení endogenní peroxidázové aktivity pomocí 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 minut.
6. Promytí řezů v 0,01 M PBS 3 x 5 minut.
7. Inkubace s roztokem avidinu 15 minut.
8. Promytí řezů v PP 3 x 5 minut.
9. Inkubace s roztokem biotinu 15 minut.
10. Promytí řezů v PP 3 x 5 minut.
11. Pro snížení nespecifického pozadí inkubace v 2% NGS 60 minut.
12. Pro snížení nespecifického pozadí inkubace v 5% roztoku sušeného mléka 60 minut.
13. Promytí řezů v PP 3 x 5 minut.

14. Inkubace s roztokem primární protilátky anti-rPER1 a anti-rBMAL1 přes noc při 4°C.
  15. Promytí řezů v PP 3 x 5 minut.
  16. Inkubace s roztokem sekundární protilátky s navázaným biotinem 60 minut při 4°C.
  17. Promytí řezů v PP 3 x 5 minut.
  18. Inkubace s roztokem avidin/biotin/peroxidáza (ABC) 60 minut při 4°C.
  19. Promytí řezů v PP 2 x 5 minut.
  20. Promytí řezů v 0,01 M PBS 3 x 5 minut.
  21. Inkubace s roztokem diaminobenzidinu (DAB), řezy musí získat rezavě hnědé zbarvení.
  22. Promytí řezů v 0,01 M PBS 3 x 5 minut.
  23. Odvodnění a fixace řezů pomocí alkoholové a xylenevé řady:
 

dH <sub>2</sub> O	1 minuta
70% ethanol	5 minut
96% ethanol	2 x 5 minut
xylene	3 x 5 minut
- Zamontování preparátů pomocí DPX a krycího sklíčka.

#### **3.4.1.2. Hodnocení rPER1 a rBMAL1 imunopozitivních buněk v tkáni kolorektální části tlustého střeva**

K detekci a sledování lokalizace imunopozitivních rPER1 a rBMAL1 proteinů byl vždy vybrán alespoň jeden z trojice řezů kolorektální části tlustého střeva každého zvířete umístěných na sklíčku. Detekce a lokalizace imunopozitivních buněk byla stanovena pomocí digitální analýzy obrazu (software MicroImage, Olympus) na světelném mikroskopu AX70.

### **3.4.2. Imunocytochemie s využitím sekundární protilátky značené fluorochromem**

K detekci a sledování buněčné lokalizace rBMAL1 proteinu v tkáni kolorektální části tlustého střeva byla použita fluorescenčně značená sekundární protilátka Alexa Fluor 594. Pro kontrolu, zda se rBMAL1 nachází v jádře nebo cytoplasmě buňky byly řezy barveny fluorescenčním barvivem DAPI, které specificky váže jadernou DNA.

#### **Přístroje**

- Cryo-cut Leica CM 1850
- Mikroskop Olympus AX70 s připojenou CCD kamerou Sony a počítačem
- Mikroskop Olympus CX40
- pH metr Denver Instruments BASIC

#### **Chemikálie**

- Dihydrogenfosforečnan sodný, dihydrát ( $M_r = 156,01$ ) (Lachema)
- Hydrogenfosforečnan sodný, dodekahydrát ( $M_r = 358,14$ ) (Penta)
- Hydrogenfosforečnan sodný, bezvodý ( $M_r = 141,96$ ) (Sigma)
- Sušené mléko (Mili)
- Paraformaldehyd (Fluka)
- Hovězí sérový albumin (BSA) (Sigma)
- Chlorid sodný (Sigma)
- Chlorid draselný (Lachema)
- Azid sodný (Lachema)
- Triton X-100 (Sigma)
- Primární anti-rBMAL1 polyklonální protilátka (doplnit firmu), zásobní roztok ředěný 1:1
- Sekundární protilátka s navázanou fluorescenční barvou Alexa Fluor 594 (Invitrogen), zásobní roztok ředěný 1:1
- Vectastain Elite ABC kit (Vector Laboratories):
  - Normální kozí sérum (NGS)

- Sekundární protilátka s navázaným biotinem
- Avidin
- Biotin s navázanou křenovou peroxidázou H
- Vectashield montovací médium pro fluorescenci s DAPI kit (Vector Laboratories)

## Roztoky

Množství připravených roztoků odpovídá spotřebě při zpracování 5 skel (4 skla pro detekci rBMAL1, 1 sklo jako negativní kontrola). Do jedné kyvety se vejde 5 skel a 10 ml roztoku.

- 0,01 M PBS (fyziologický roztok pufrovaný fosfáty)  
3,58 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  + 1,56 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  + 8 g NaCl + 0,2 g KCl  
Rozpuštěno ve 1 litru ddH<sub>2</sub>O, upraveno na pH= 7,2, přefiltrováno
- 0,2 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$   
31,2 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  rozpuštěno v 1 litru ddH<sub>2</sub>O
- 0,2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   
71,6 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  rozpuštěno v 1 litru ddH<sub>2</sub>O
- 4% PFA (paraformaldehyd)  
810 ml 0,2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  + 190 ml 0,2 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  + 80 g paraformaldehydu  
Rozpuštěno při 65°C, doplněno do 1 litru ddH<sub>2</sub>O, přefiltrováno, upraveno na pH= 7,2, používat vždy čerstvě připravený roztok
- Inkubační pufr (IP): 1% BSA/ 0,3% Triton X-100/ 0,01 M PBS  
0,5 g BSA + 140 µl Triton X-100 + 50 ml 0,01 M PBS, používat vždy čerstvě připravený roztok
- Promývací pufr (PP): 0,3% BSA/ 0,3% Triton X-100/ 0,01 M PBS  
0,5 g BSA + 140 µl Triton X-100 + 150 ml 0,01 M PBS, používat vždy čerstvě připravený roztok
- 10% roztok NGS (normální kozí sérum)  
1 ml NGS + 10 ml IP, používat vždy čerstvě připravený roztok
- 10% roztok sušeného mléka  
1 g sušeného mléka + 10 ml IP, používat vždy čerstvě připravený roztok
- Roztok primární protilátky anti-rBMAL1 1:2500



0,32  $\mu$ l anti-rBMAL1 (zásobní roztok ředěný 1:1) + 800  $\mu$ l IP, na 1 sklo nanášet 200  $\mu$ l roztoku, vždy čerstvě připravený roztok

- Roztok sekundární protilátky s navázanou fluorescenční barvou Alexa Fluor 594 1:600  
1,6  $\mu$ l sekundární protilátky s navázanou fluorescenční barvou Alexa Fluor 594 + 1 ml IP, na 1 sklo nanášet 200  $\mu$ l roztoku, vždy čerstvě připravený roztok uchovávat při 4°C ve tmě

### 3.4.2.1. Postup

1. Příprava řezů z tkáně kolorektální části tlustého střeva uchovávané v cryomountových bločcích:  
na cryo-cutu Leica CM 1850 byly připraveny 12  $\mu$ m řezy z dané tkáně při teplotě -25°C, řezy byly nanесeny na podložní skla SuperFrost Plus (3 řezy z každého individuálního zvířete/1 sklo) a skladovány až do dalšího zpracování v -80°C.
2. Skla vyndat z -80°C, nechat 10-20 minut ležet na podložce při pokojové teplotě k oschnutí.
3. Fixace řezů v 4% PFA 15 minut.
4. Promytí řezů v PP 3 x 5 minut.
5. Pro snížení nespecifického pozadí inkubace v 10% NGS 60 minut.
6. Pro snížení nespecifického pozadí inkubace v 10% roztoku sušeného mléka 60 minut.
7. Promytí řezů v PP 3 x 5 minut.
8. Inkubace s roztokem primární protilátky anti-rBMAL1 přes noc při 4°C.
9. Promytí řezů v PP 3 x 5 minut.
10. Inkubace s roztokem sekundární protilátky s navázanou fluorescenční barvou Alexa Fluor 594 60 minut při 4°C ve tmě.
11. Promytí řezů v 0,01 M PBS 3 x 5 minut, nutno zamezit přístupu přímého světla.
12. Zamontování preparátů pomocí montovacího média Vectashield s DAPI a krycího sklíčka, preparáty uchovávat při 4°C ve tmě.

#### **3.4.2.2. Hodnocení rBMAL1 fluorescenčně barvených buněk v tkáni kolorektální části tlustého střeva**

K detekci a sledování lokalizace fluorescenčně barvených rBMAL1 proteinů byl vždy vybrán alespoň jeden z trojice řezů každého zvířete umístěných na sklíčku. Detekce a lokalizace fluorescenčně značených buněk byla stanovena nasnímáním obrazu mikroskopem Olympus AX70 s připojenou CCD kamerou a počítačem. Pro kontrolu jaderné a cytoplazmatické lokalizace rBMAL1 proteinů byly stejným způsobem nasnímány řezy barvené DAPI.

### 3.5. Statistická analýza

Získaná data byla vyhodnocena pomocí základních statistických metod:

aritmetický průměr:  $\bar{x} = \sum x_i / n$

směrodatná odchylka:  $SD = [(1/n-1) * \sum (x_i - \bar{x})^2]^{1/2}$

střední chyba průměru:  $SEM = (SD/n)^{1/2}$

Pro stanovení vlivu času na průběh 24-hodinové a 12-hodinové exprese (statistická významnost rytmu) hodinových genů a genu *rWeel* v jednotlivých částech střeva byla použita jednoduchá analýza variance (ANOVA) s následným Student-Newman-Keulsovým testem. Stejný statistický postup byl použit i pro hodnocení vývoje rytmické exprese hodinových genů v tlustém střevu. Pro stanovení statistické významnosti rozdílů rytmu mezi jednotlivými částmi střeva během 12-hodinového měření byla použita dvojná analýza variance s následným Student-Newman-Keulsovým testem.

## 4. VÝSLEDKY

### 4.1. Detekce exprese hodinových genů a genu *rWeel* v epitelu jednotlivých částí střeva potkana

#### 4.1.1. Exprese hodinových genů v dvanáctníku, lačníku, kyčelníku a tlustém střevu během 24 hodin

V této části diplomové práce jsme se pokusili dokázat přítomnost cirkadiálního oscilátoru v jednotlivých částech střeva (dvanáctník, lačník, kyčelník, tlusté střevo). Studována byla exprese hodinových genů *rPer1*, *rPer2*, *rBmal1*, *rRev-erb-α*, *rClock*, *rCry1* a tzv. „housekeeping genu“ *rβ-2 mikroglobulinu*, který byl použit jako normalizátor. Získaná data byla kvantifikována relativně. Pro statistické hodnocení změn hladin mRNA v čase byla použita jednoduchá analýza variance a následný Student-Newman-Keulsův test.

##### 4.1.1.1. Exprese hodinových genů v dvanáctníku

###### Exprese *rPer1*

Jednoduchá analýza variance odhalila významný vliv času na expresi genu *rPer1* v dvanáctníku ( $F=4,587$ ;  $p<0,05$ ) (graf 1a).

Hladiny *rPer1* mRNA narůstaly mezi CT4 a CT12 ( $p<0,05$ ) a poté opět klesaly mezi CT12 a CT24 ( $p<0,05$ ). Maximální hodnoty byly dosaženy v CT12 ( $p<0,05$ ).

###### Exprese *rPer2*

Jednoduchá analýza variance odhalila významný vliv času na expresi genu *rPer2* v dvanáctníku ( $F=12,309$ ;  $p<0,01$ ) (graf 1b).

K výraznému nárůstu exprese genu *rPer2* došlo mezi CT8 a CT16 ( $p<0,05$ ). Pokles z vysokých hodnot nastal mezi CT16 a CT20 ( $p<0,05$ ). Hladina *rPer2* mRNA

byla významně vyšší v CT12-16 v porovnání s CT4, CT24 ( $p < 0,01$ ) a CT8, CT20 ( $p < 0,05$ ).

### **Expresce *rBmal1***

Jednoduchá analýza variance odhalila významný vliv času na expresi genu *rBmal1* v dvanáctníku ( $F=6,262$ ;  $p < 0,05$ ) (graf 1c).

K významnému poklesu hodnot došlo mezi CT4 a CT8 ( $p < 0,05$ ). Expresce genu *rBmal1* dosahovala minimálních hodnot mezi CT8-CT16. K prudkému nárůstu hladiny *rBmal1* mRNA poté došlo mezi CT16 a CT24 ( $p < 0,05$ ). Expresce genu *rBmal1* byla v CT4 a CT24 významně vyšší než v CT8-16 ( $p < 0,05$ ).

### **Expresce *rRev-erb-α***

Pomocí jednoduché analýzy variance byl odhalen významný vliv času na expresi genu *rRev-erb-α* v dvanáctníku ( $F=8,286$ ;  $p < 0,01$ ) (graf 1d).

Nárůst exprese *rRev-erb-α* nastal mezi CT24 a CT8 ( $p < 0,01$ ). Maximálních hodnot dosahovala expresce genu v CT8. Významný pokles nastal mezi CT8 a CT20 ( $p < 0,01$ ). Od CT20-24 byly hladiny mRNA daného genu sníženy. Hladina *rRev-erb-α* mRNA byla významně vyšší v CT8 vůči hodnotám v CT16 ( $p < 0,05$ ) a v CT20-24 ( $p < 0,01$ ). Zároveň byly naměřeny vyšší hladiny mRNA v CT4 a CT12 než v CT20 a CT24 ( $p < 0,05$ ).

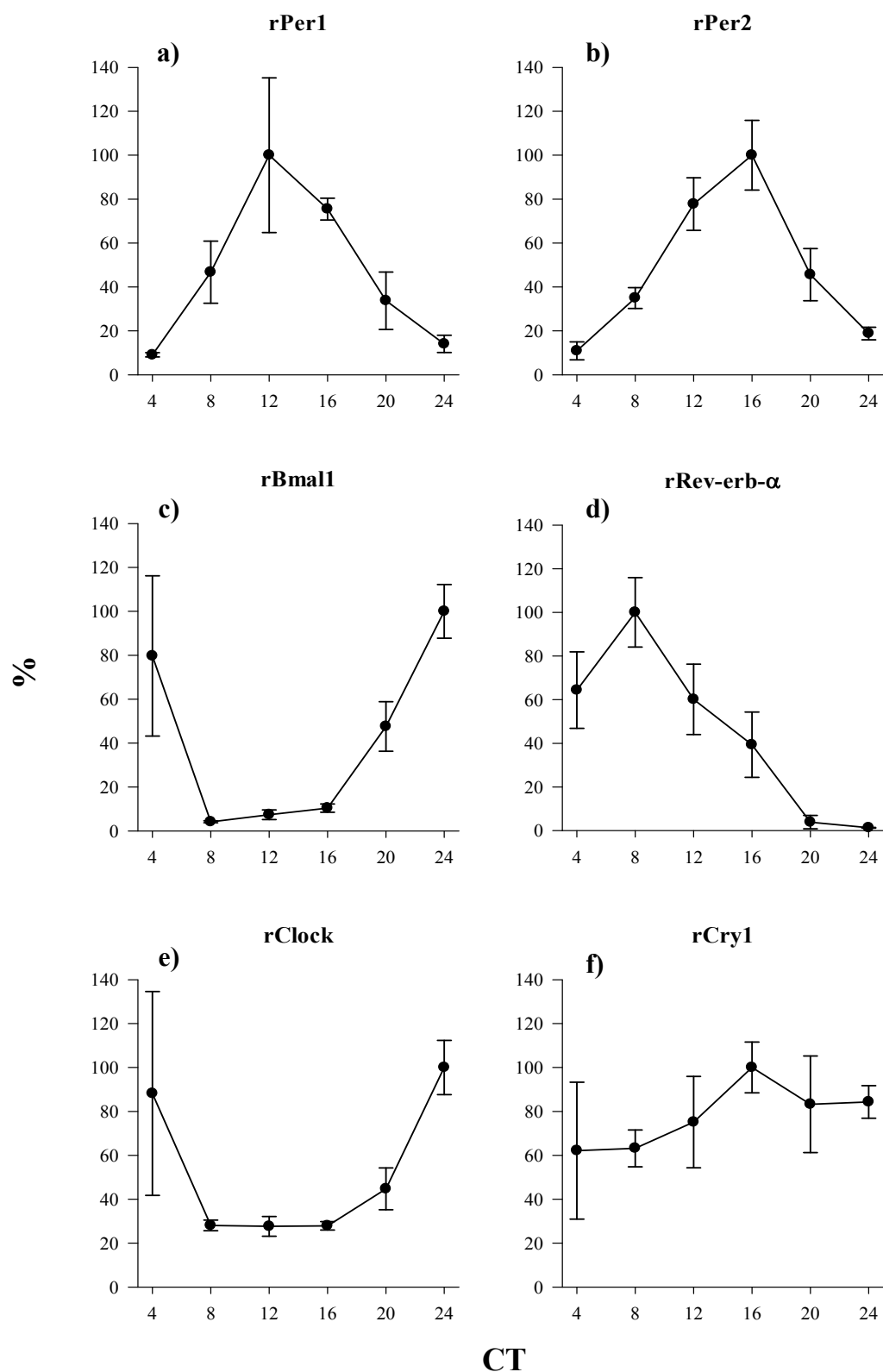
### **Expresce *rClock***

Jednoduchá analýza variance neodhalila významný vliv času na expresi genu *rClock* v dvanáctníku, rozdíl mezi jednotlivými měřeními nebyl významný ( $F=2,673$ ;  $p=0,076$ ) (graf 1e).

Přestože je rytmus exprese genu *rClock* na grafickém znázornění naznačen, nepodařilo se ho statisticky prokázat. Důvodem jsou pravděpodobně velké rozptyly naměřené v časovém bodě CT4.

### **Expresce *rCry1***

Jednoduchá analýza variance neodhalila významný vliv času na expresi genu *rCry1* v dvanáctníku, rozdíl mezi jednotlivými časovými body nebyl významný ( $F=0,576$ ;  $p=0,717$ ) (graf 1f).



**Graf 1:** Expres hodinyvých genů v epitelu dvanáctníku. Expres *rPer1*, *rPer2*, *rBmal1*, *rRev-erb-α*, *rClock* a *rCry1* byla sledována během 24 hodin. Na ose x je vyznačen cirkadiánní čas (CT), relativní množství mRNA je vyznačeno v % maximální hodnoty. Dané hodnoty vyjadřují vždy průměr ze tří zvířat  $\pm$  SEM.

#### 4.1.1.2. Exprese hodinových genů v lačníku

##### Exprese *rPer1*

Jednoduchá analýza variance prokázala významný vliv času na expresi genu *rPer1* v lačníku ( $F=14,592$ ;  $p<0,01$ ) (graf 2a).

Významný nárůst exprese *rPer1* genu nastal mezi CT8 a CT12 ( $p<0,01$ ). Maximálních hodnot dosahoval exprimovaný gen v CT12. K významnému poklesu hladiny mRNA došlo mezi CT12 a CT16 ( $p<0,01$ ). Od CT16 do CT24 byly mRNA hladiny trvale sníženy. Hladina *rPer1* mRNA byla významně vyšší v CT12 v porovnání se všemi ostatními časovými body ( $p<0,01$ ).

##### Exprese *rPer2*

S využitím jednoduché analýzy variance byl odhalen významný vliv času na expresi genu *rPer2* v lačníku ( $F=6,658$ ;  $p<0,01$ ) (graf 2b).

K výraznému nárůstu hladiny mRNA daného genu došlo mezi CT8 a CT16 ( $p<0,05$ ). V CT16 dosahovala hladina mRNA maximálních hodnot. Pokles z vysokých hodnot nastal v CT16-24 ( $p<0,01$ ). Exprese genu *rPer2* dosahovala významně vyšších hodnot v CT16 než v CT4, CT24 ( $p<0,01$ ) a v CT8 ( $p<0,05$ ). Zároveň byla zjištěna významně vyšší hladina *rPer2* mRNA v CT12 v porovnání s CT4 ( $p<0,05$ ).

##### Exprese *rBmall*

Jednoduchá analýza variance odhalila významný vliv času na expresi genu *rBmall* v lačníku ( $F=12,136$ ;  $p<0,01$ ) (graf 2c).

Mezi CT24 a CT4 došlo k významnému snížení exprese genu ( $p<0,01$ ). Hladiny *rBmall* mRNA dosahovaly nízkých hodnot mezi CT8-16. K významnému nárůstu exprese genu došlo mezi CT16 a CT24 ( $p<0,01$ ). Hladiny *rBmall* mRNA byly v CT24 významně vyšší než v CT4-16 ( $p<0,01$ ) a v CT20 ( $p<0,05$ ). Také v CT20 dosahovaly hladiny mRNA výrazně vyšších hodnot v porovnání s v CT8, CT12 ( $p<0,05$ ).

##### Exprese *Rev-erb-α*

Pomocí jednoduché analýzy variance byl prokázán významný vliv času na expresi genu *rRev-erb-α* v lačníku ( $F=27,828$ ;  $p<0,01$ ) (graf 2d).

K významnému nárůstu exprese genu došlo mezi CT24 a CT4 ( $p < 0,01$ ). Nejvíce byl gen *rRev-erb-α* exprimován v CT4 a CT8. K významnému snížení hladiny mRNA došlo mezi CT12 a CT16 ( $p < 0,01$ ). Od CT16 do CT24 byly hladiny mRNA stabilně nízké. Hladiny *rRev-erb-α* mRNA nabývaly významně vyšších hodnot v CT4, CT8, CT12 oproti nízkým hodnotám v CT16-24 ( $p < 0,01$ ).

### **Expresce *rClock***

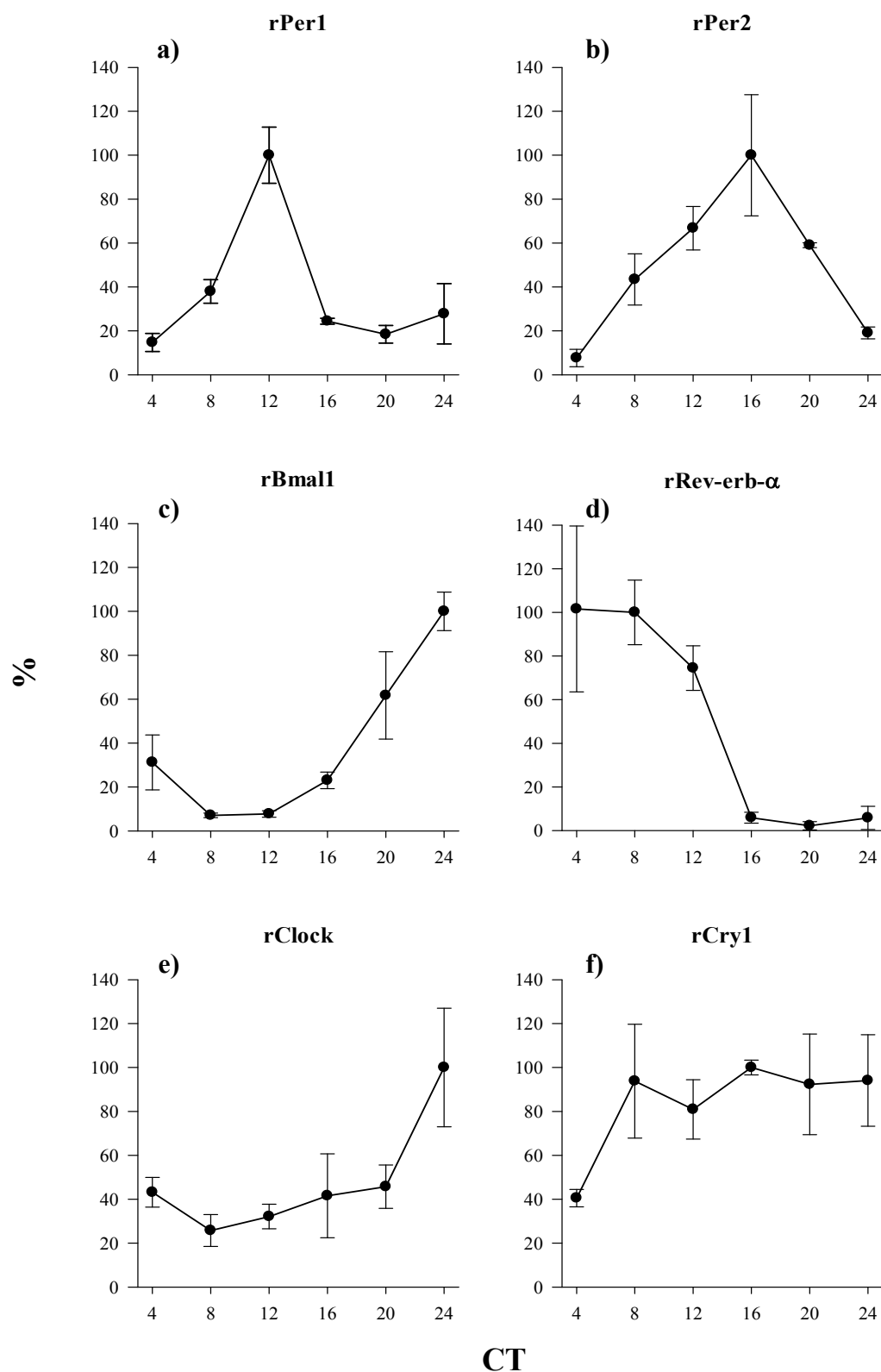
Jednoduchá analýza variance odhalila významný vliv času na expresi genu *rClock* v lačníku ( $F=3,199$ ;  $p < 0,05$ ) (graf 2e).

Hladiny *rClock* mRNA významně klesaly v rozmezí CT24 až CT8 ( $p < 0,05$ ). Od CT8 do CT20 dosahovala exprese genu stabilních středních hodnot. K nárůstu exprese genu došlo mezi CT20 a CT24. Hladina mRNA byla nejvyšší v CT24. Expresce *rClock* byla významně vyšší v CT24 oproti CT8 a CT12 ( $p < 0,05$ ).

### **Expresce *rCry1***

Jednoduchá analýza variance neukázala významný vliv času na expresi genu *rCry1* v lačníku, rozdíl mezi jednotlivými časovými body nebyl statisticky významný ( $F=1,576$ ;  $p=0,240$ ) (graf 2f).





**Graf 2:** Expresse hodinových genů v epitelu lačníku. Expresse *rPer1*, *rPer2*, *rBmal1*, *rRev-erb-α*, *rClock* a *rCry1* byla sledována během 24 hodin. Na ose x je vyznačen cirkadiánní čas (CT), relativní množství mRNA je vyznačeno v % maximální hodnoty. Dané hodnoty vyjadřují vždy průměr ze tří zvířat  $\pm$  SEM.

#### 4.1.1.3. Exprese hodinových genů v kyčelníku

##### Exprese *rPer1*

S využitím jednoduché analýzy variance byl odhalen významný vliv času na expresi genu *rPer1* v kyčelníku ( $F=10,424$ ;  $p<0,01$ ) (graf 3a).

Hladina *rPer1* mRNA se významně zvyšovala od CT8 do CT12 ( $p<0,01$ ). V CT12 dosahovala maximálních hodnot. K poklesu z vysokých hodnot došlo mezi CT12 a CT16 ( $p<0,01$ ). Od CT16 do CT24 byly hladiny mRNA trvale na nižších hodnotách. Exprese genu *rPer1* dosahovala významně vyšších hodnot v CT12 v porovnání se všemi ostatními časovými body ( $p<0,01$ ).

##### Exprese *rPer2*

Jednoduchá analýza variance neprokázala významný vliv času na expresi genu *rPer2* v kyčelníku. Naměřené hodnoty těsně nesplnily kritéria pro statistickou analýzu ( $F=3,084$ ;  $p=0,051$ ) (graf 3b).

Přestože je rytmus exprese genu *rPer2* na grafickém znázornění naznačen, nepodařilo se ho statisticky prokázat. Důvodem jsou pravděpodobně velké rozptyly naměřené v časovém bodě CT8.

##### Exprese *rBmal1*

Pomocí jednoduché analýzy variance byl prokázán významný vliv času na expresi genu *rBmal1* v kyčelníku ( $F=9,073$ ;  $p<0,01$ ) (graf 3c).

K významnému poklesu hodnot došlo mezi CT24 a CT4 ( $p<0,01$ ). Exprese genu *rBmal1* dosahovala minimálních hodnot mezi CT4-CT20. K prudkému nárůstu hladin *rBmal1* mRNA došlo mezi CT20 a CT24 ( $p<0,01$ ). V CT24 byla hladina mRNA nejvyšší. Exprese genu *rBmal1* byla v CT24 významně vyšší v porovnání se všemi ostatními časovými body ( $p<0,01$ ).

##### Exprese *rRev-erb-α*

Jednoduchá analýza variance odhalila významný vliv času na expresi genu *rRev-erb-α* v kyčelníku ( $F=19,463$ ;  $p<0,01$ ) (graf 3d).

Rychlý nárůst exprese *rRev-erb-α* nastal mezi CT4 a CT8 ( $p<0,01$ ). Maximálních hodnot dosahoval exprimovaný gen v CT8 a CT12. K významnému

poklesu hladin mRNA došlo mezi CT12 a CT16 ( $p < 0,01$ ). Od CT16-24 byly hladiny mRNA daného genu trvale nízké. Hladiny *rRev-erb-α* mRNA dosahovaly významně vyšších hodnot v CT8 a CT12 než v CT4 a CT16-24 ( $p < 0,01$ ).

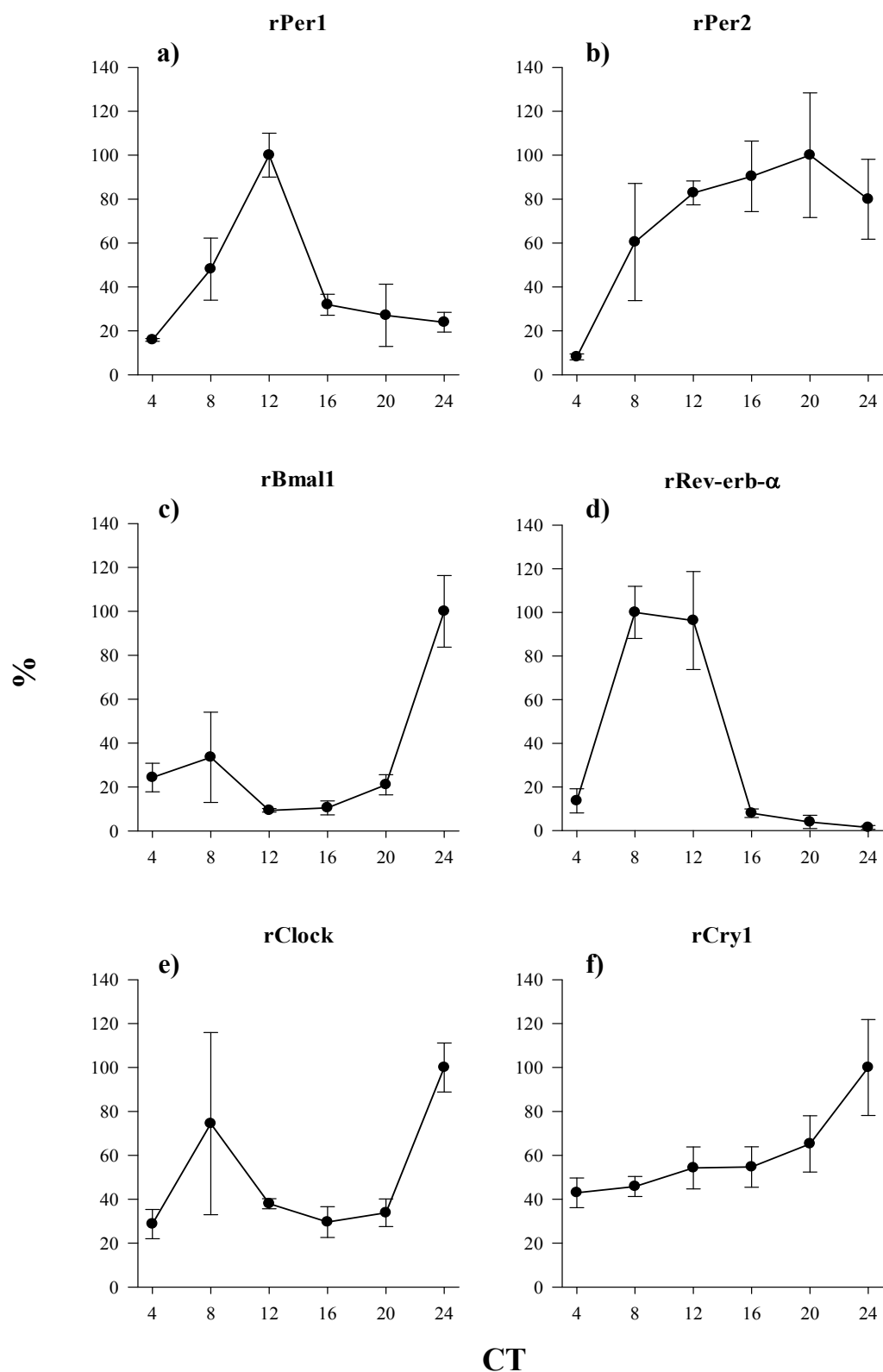
### **Expresa *rClock***

Jednoduchá analýza variance neodhalila významný vliv času na expresi genu *rClock* v kyčelníku ( $F=2,642$ ;  $p=0,078$ ) (graf 3e).

Rytmus exprese genu *rClock* je na grafickém znázornění naznačen, přesto se ho nepodařilo statisticky prokázat. Důvodem jsou pravděpodobně velké rozptyly naměřené v časovém bodě CT8.

### **Expresa *rCry1***

Jednoduchá analýza variance neukázala významný vliv času na expresi genu *rCry1* v kyčelníku, rozdíl mezi jednotlivými měřeními nebyl statisticky významný ( $F=2,961$ ;  $p=0,057$ ) (graf 3f).



**Graf 3:** Expres hodinových genů v epitelu kyčelníku. Expres *rPer1*, *rPer2*, *rBmal1*, *rRev-erb-α*, *rClock* a *rCry1* byla sledována během 24 hodin. Na ose x je vyznačen cirkadiánní čas (CT), relativní množství mRNA je vyznačeno v % maximální hodnoty. Dané hodnoty vyjadřují vždy průměr ze tří zvířat ± SEM.

#### 4.1.1.4. Exprese hodinových genů v tlustém střevu

##### Exprese *rPer1*

S využitím jednoduché analýzy variance byl prokázán významný vliv času na expresi genu *rPer1* v tlustém střevu ( $F=3,726$ ;  $p<0,05$ ) (graf 4a).

Hladiny *rPer1* mRNA významně rostly mezi CT8 a CT12 ( $p<0,05$ ). V CT12 dosahovala hladina nejvyšších hodnot. K poklesu z vysokých hodnot došlo mezi CT12 a CT16 ( $p<0,05$ ). V CT20 a CT24 byly hladiny mRNA trvale na nízkých hodnotách podobně jako v CT4 a CT8. Exprese genu *rPer1* dosahovala významně vyšších hodnot v CT12 než ve všech ostatních časových bodech ( $p<0,05$ ).

##### Exprese *rPer2*

Pomocí jednoduché analýzy variance byl odhalen významný vliv času na expresi genu *rPer2* v tlustém střevu ( $F=4,311$ ;  $p<0,05$ ) (graf 4b).

K významnému nárůstu hladiny mRNA došlo mezi CT8 a CT12 ( $p<0,05$ ). Od CT12 do CT20 hladiny mRNA klesaly až dosáhly středních hodnot, kterých nabývaly i v CT24 a CT4. Významně vyšší hladiny *rPer2* mRNA byly naměřeny v CT12 a CT16 v porovnání s nízkými hodnotami v CT8 ( $p<0,05$ ).

##### Exprese *rBmal1*

Jednoduchá analýza variance odhalila významný vliv času na expresi genu *rBmal1* v tlustém střevu ( $F=4,819$ ;  $p<0,05$ ) (graf 4c).

Hladina *rBmal1* mRNA nabývala maxima v CT4. K významnému poklesu hodnot došlo mezi CT4 a CT8 ( $p<0,05$ ). Hladiny *rBmal1* mRNA dosahovaly nižších hodnot mezi CT8-CT20. K nárůstu hladin *rBmal1* mRNA poté došlo mezi CT20 a CT24. Gen *rBmal1* byl významně více exprimován v CT4 oproti CT8-20 ( $p<0,05$ ).

##### Exprese *rRev-erb-α*

Jednoduchá analýza variance odhalila významný vliv času na expresi genu *rRev-erb-α* v tlustém střevu ( $F=3,020$ ;  $p<0,01$ ) (graf 4d).

K nárůstu exprese *rRev-erb-α* došlo mezi CT4 a CT12 ( $p<0,05$ ). Maximálních hodnot dosahoval exprimovaný gen v CT12. Významný pokles nastal mezi CT12 a CT16 ( $p<0,01$ ). V CT20-24 klesly hladiny mRNA na trvale nízkou hodnotu. Hladina

*rRev-erb- $\alpha$*  mRNA byla významně vyšší v CT12 oproti nižším hodnotám v CT16-24 ( $p < 0,01$ ) a v CT4 ( $p < 0,05$ ).

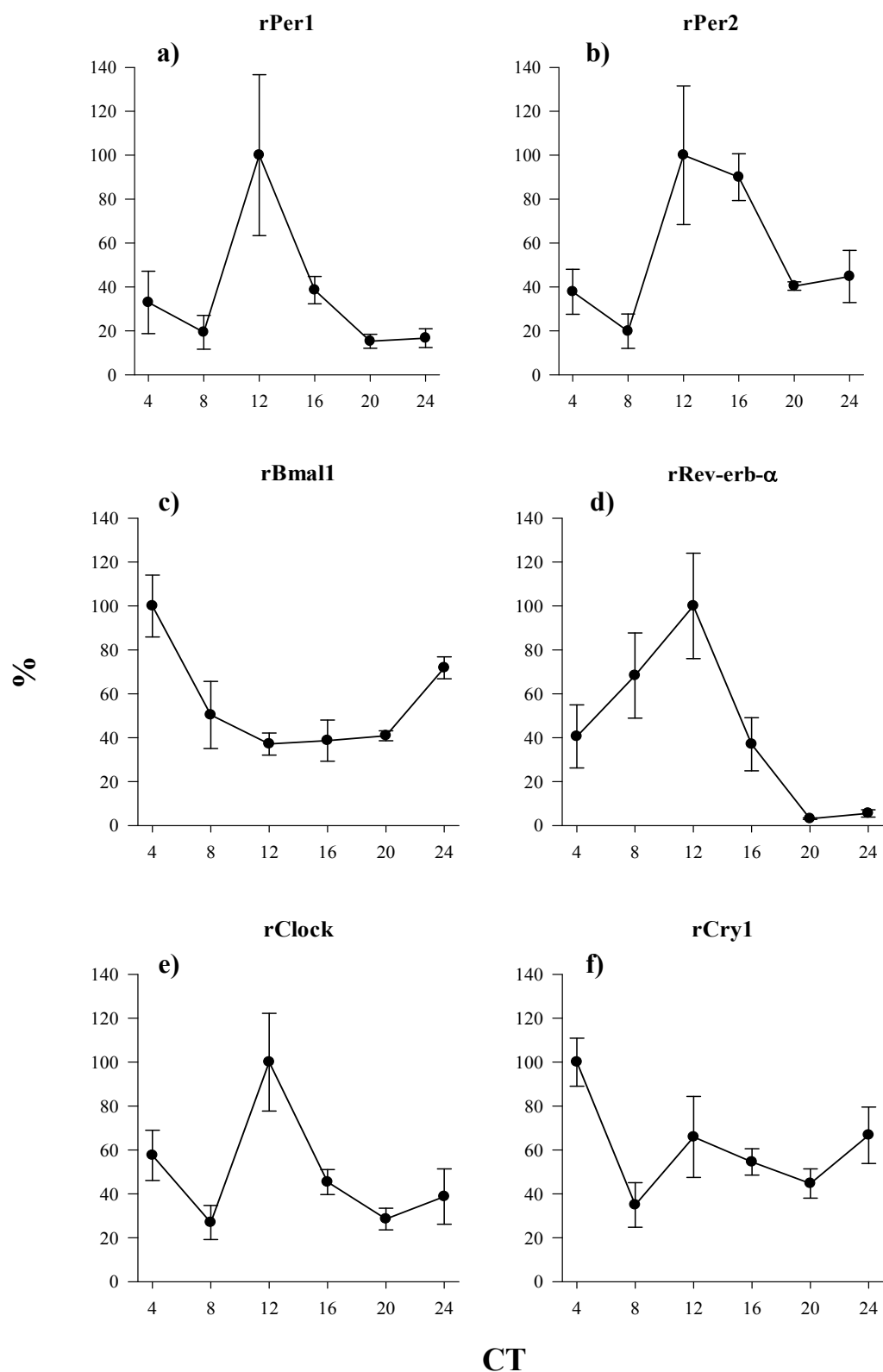
### **Expres *rClock***

Jednoduchá analýza variance neprokázala významný vliv času na expresi genu *rClock* v tlustém střevu. Naměřené hodnoty těsně nesplnily kritéria pro statistickou analýzu ( $F=3,020$ ;  $p=0,054$ ) (graf 4e).

Přestože je rytmus exprese genu *rClock* na grafickém znázornění naznačen, nepodařilo se ho statisticky prokázat. Důvodem jsou pravděpodobně naměřené velké rozptyly v časovém bodě CT12.

### **Expres *rCry1***

Jednoduchá analýza variance neukázala významný vliv času na expresi genu *rCry1* v tlustém střevu, rozdíl mezi jednotlivými měřeními nebyl statisticky významný ( $F=1,584$ ;  $p=0,238$ ) (graf 4f).

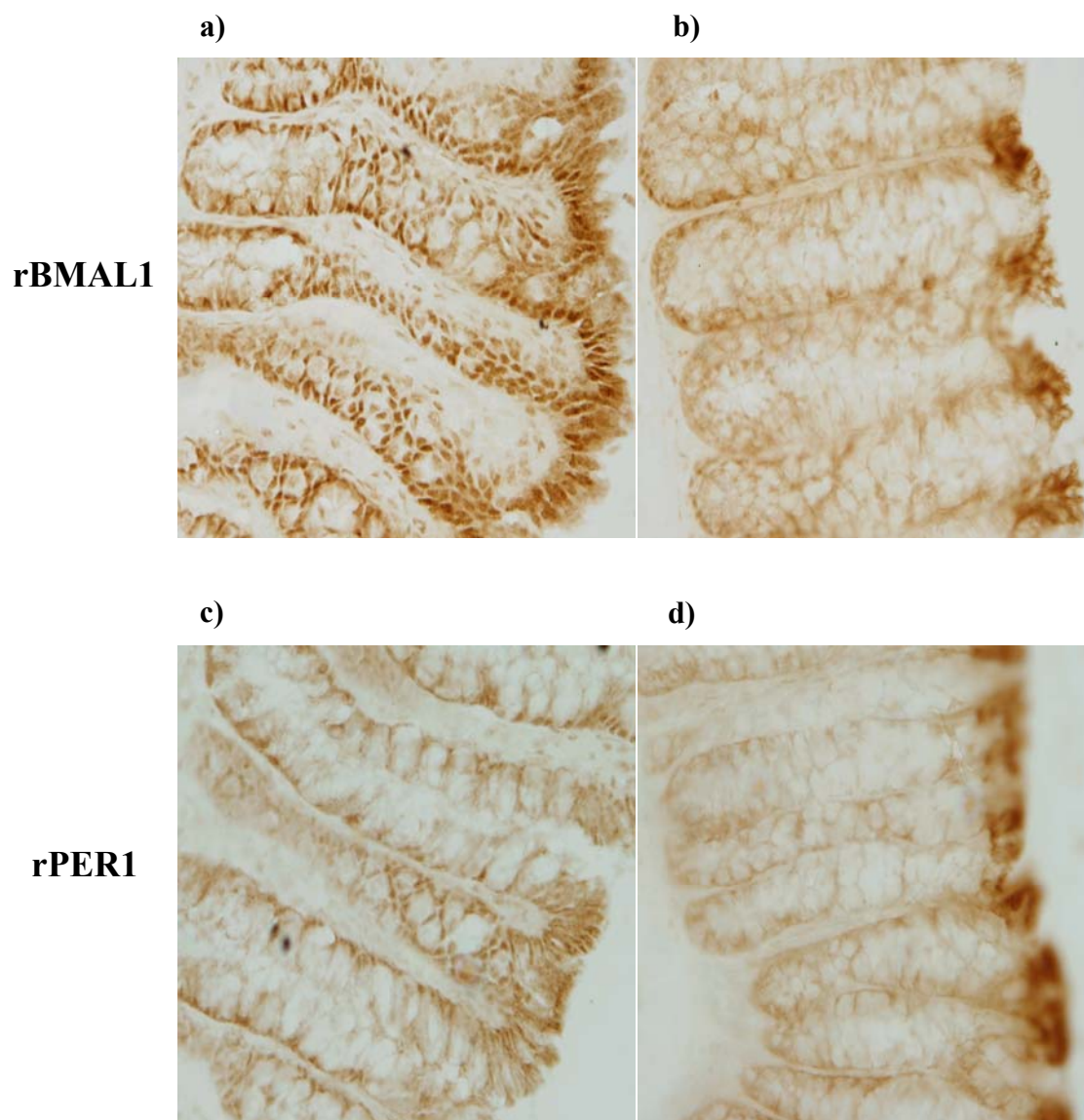


**Graf 4:** Expres hodinových genů v epitelu tlustého střeva. Expres *rPer1*, *rPer2*, *rBmal1*, *rRev-erb-α*, *rClock* a *rCry1* byla sledována během 24 hodin. Na ose x je vyznačen cirkadiánní čas (CT), relativní množství mRNA je vyznačeno v % maximální hodnoty. Dané hodnoty vyjadřují vždy průměr ze tří zvířat  $\pm$  SEM.

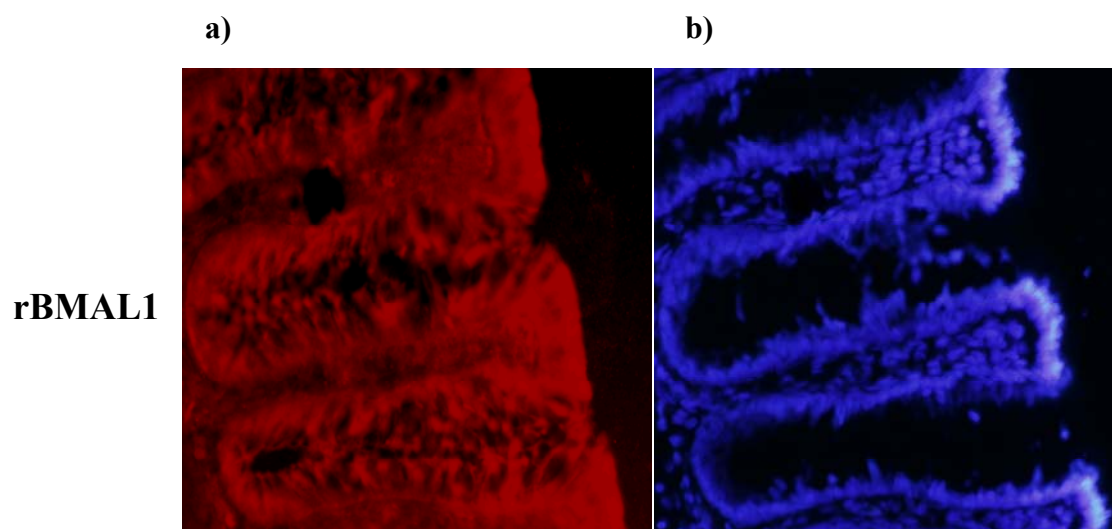
#### **4.1.2. Detekce a sledování lokalizace rPER1 a rBMAL1 proteinů v kolorektální části tlustého střeva**

Proteiny rPER1 a rBMAL1 byly detekovány pomocí imunocytochemie s využitím substrátu diaminobenzidinu (DAB). Bylo prokázáno, že imunopozitivní buňky jsou lokalizovány převážně jednotlivě v kryptách střevního epitelu. U obou proteinů byl detekován nejvyšší počet imunopozitivních buněk během subjektivního dne (obr. 6). Pro potvrzení tohoto nálezu byl protein rBMAL1 detekován také pomocí imunocytochemie s fluorescenčním značením. Jako kontrola jaderné lokalizace byly použity řezy barvené DAPI (obr.7)





**Obr. 6:** Porovnání imunoreaktivity proteinů a) a b) rBMAL1, c) a d) rPER1 v epitelu kolorektální části tlustého střeva během a) a c) subjektivního dne, b) a d) subjektivní noci.



**Obr. 7:** Detekce imunoreaktivity proteinu rBMAL1 v epitelu kolorektální části tlustého střeva. a) rBMAL1 protein značen fluorescenční barvou Alexa Fluor 594, b) barvení jaderné DNA pomocí DAPI.

### 4.1.3. Exprese hodinových genů v dvanáctníku, lačníku, kyčelníku a tlustém střevu během 12 hodin

V této části diplomové práce byly detailně sledovány profily exprese hodinových genů během 12 hodin odpovídajících původní světlé fázi dne, tj. CT0-CT12, ve snaze porovnat fázi rytmické exprese mezi jednotlivými částmi střeva (dvanáctník, lačník, kyčelník, tlusté střevo). Studována byla exprese genů *rPer1*, *rPer2*, *rBmal1*, *rRev-erb-a* a tzv. „housekeeping genu“ *rβ-2 mikroglobulinu*, který byl použit jako normalizátor. Získaná data byla kvantifikována relativně. Pro statistické hodnocení změn hladin mRNA v čase byla použita jednoduchá analýza variance a následný Student-Newman-Keulsův test. Pro stanovení statistické významnosti rozdílů rytmu mezi jednotlivými částmi střeva byla použita dvojná analýza variance s následným Student-Newman-Keulsovým testem.

#### 4.1.3.1. Exprese *rPer1*

##### Dvanáctník

Jednoduchá analýza variance odhalila významný vliv času na expresi genu *rPer1* ( $F=21,29$ ;  $p<0,01$ ) (graf 5a).

Od CT2 do CT7 nabývaly hladiny *rPer1* mRNA stálých nízkých hodnot. K významnému zvýšení exprese genu došlo mezi CT7 a CT11 ( $p<0,01$ ). Hladina mRNA byla nejvyšší v CT11. Hladiny *rPer1* mRNA byly významně vyšší v CT10-12 vůči hodnotám v CT2-9 ( $p<0,01$ ). Zároveň byly naměřeny vyšší hladiny mRNA v CT8 a CT9 než v CT2-7 ( $p<0,05$ ).

##### Lačník

Jednoduchá analýza variance prokázala významný vliv času na expresi genu *rPer1* ( $F=41,07$ ;  $p<0,01$ ) (graf 5b).

Mezi CT2 a CT7 se pohybovaly hladiny *rPer1* mRNA na nízkých hodnotách. K prudkému nárůstu exprese došlo mezi CT7 a CT8 ( $p<0,01$ ). Další zvýšení hladin mRNA nastalo mezi CT9 a CT10 ( $p<0,01$ ). Nejvíce byl gen exprimován v CT10-12. Hladiny *rPer1* mRNA byly významně vyšší v CT10-12 v porovnání se všemi ostatními

časovými body ( $p<0,01$ ). Také v CT8 a CT9 dosahovaly hladiny vyšších hodnot než v CT2-7 ( $p<0,05$ ).

### **Kyčelník**

Jednoduchá analýza variance odhalila významný vliv času na expresi genu *rPer1* ( $F=17,63$ ;  $p<0,01$ ) (graf 5c).

Hladiny *rPer1* mRNA dosahovaly stabilně zhruba 20% hodnot mezi CT2-8. K postupnému nárůstu exprese genu došlo mezi CT8 a CT12. Hladina *rPer1* mRNA byla v CT12 významně vyšší v porovnání s CT10 ( $p<0,05$ ) a CT2-9 ( $p<0,01$ ). Také v CT10 a CT11 dosahovaly hladiny mRNA výrazně vyšších hodnot než v CT2-9 ( $p<0,05$ ).

### **Tlusté střevo**

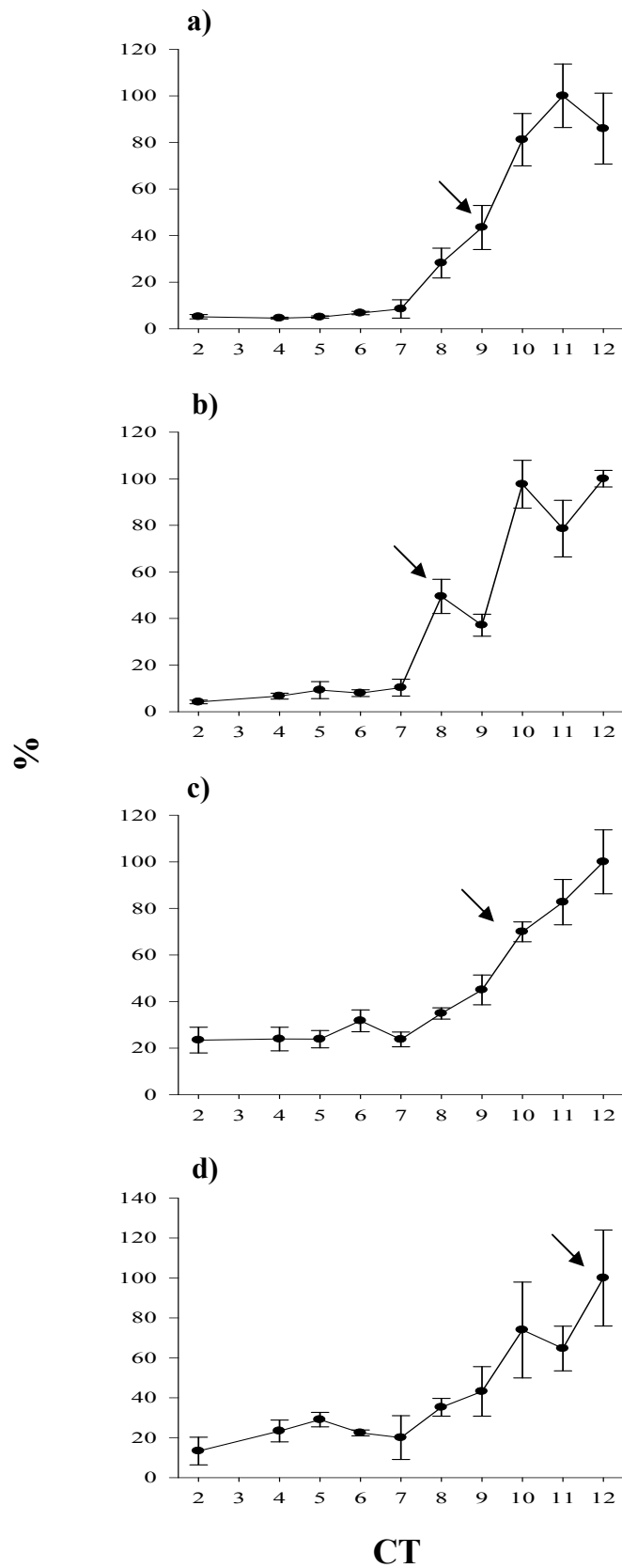
Pomocí jednoduché analýzy variance byl odhalen významný vliv času na expresi genu *rPer1* ( $F=4,76$ ;  $p<0,01$ ) (graf 5d).

Exprese genu *rPer1* se pohybovala na zhruba 20% hodnotách od CT2 do CT7. Mezi CT7 a CT12 došlo k postupnému zvýšení hladin mRNA ( $p<0,01$ ). Hodnoty v CT10-12 byly významně vyšší v porovnání s CT2-9 ( $p<0,05$ ).

Dvojná analýza variance odhalila významné rozdíly v době nárůstu exprese genu *rPer1* mezi jednotlivými částmi střeva ( $F=54,01$ ;  $p<0,01$ ).

V dvanáctníku docházelo k zvýšení hladiny *rPer1* mRNA mezi CT7 a CT9 ( $p<0,05$ ) v lačníku mezi CT7 a CT8 ( $p<0,01$ ), v kyčelníku mezi CT9 a CT10 ( $p<0,01$ ) a v tlustém střevu až teprve mezi CT9 a CT12 ( $p<0,05$ ).

## rPer1



**Graf 5:** Porovnání fáze rytmu v expresi hodinového genu *rPer1* v epitelu a) dvanáctníku b) lačníku c) kyčelníku d) tlustého střeva. Šipka označuje první signifikantní nárůst exprese genu. Na ose x je vyznačen čas (CT), relativní množství mRNA je vyjádřeno v % maximální hodnoty. Dané hodnoty vyjadřují vždy průměr ze tří zvířat  $\pm$  SEM.

#### 4.1.3.2. Exprese *rPer2*

##### Dvanáctník

Pomocí jednoduché analýzy variance byl prokázán významný vliv času na expresi genu *rPer2* ( $F=16,30$ ;  $p<0,01$ ) (graf 6a).

Od CT2 do CT7 byly hladiny *rPer2* mRNA stabilně nízké. K výraznému nárůstu hodnot došlo mezi CT7 a CT8 ( $p<0,01$ ). Exprese se poté postupně zvyšovala až na nejvyšší hodnoty v CT12 ( $p<0,01$ ). Hladiny mRNA v CT10-12 byly výrazně vyšší než v CT2-9 ( $p<0,01$ ). Zároveň dosahovala exprese genu vyšších hodnot v CT8 a CT9 oproti CT2-7 ( $p<0,05$ ).

##### Lačník

S využitím jednoduché analýzy variance byl odhalen významný vliv času na expresi genu *rPer2* ( $F=25,57$ ;  $p<0,01$ ) (graf 6b).

Hladiny *rPer2* mRNA se pohybovaly v rozmezí nízkých hodnot mezi CT2 a CT7. K významnému nárůstu exprese genu došlo mezi CT7 a CT8 ( $p<0,01$ ). Nejvíce byl gen *rPer2* exprimován v CT8. Od CT9 do CT12 byly hladiny vysoké. Hladiny *rPer2* mRNA nabývaly významně vyšších hodnot v CT8-12 oproti nízkým hodnotám v CT2-7 ( $p<0,01$ ).

##### Kyčelník

Jednoduchá analýza variance odhalila významný vliv času na expresi genu *rPer2* ( $F=8,29$ ;  $p<0,01$ ) (graf 6c).

Hladina *rPer2* mRNA dosahovala nízkých hodnot mezi CT2-7. Postupný nárůst hladiny *rPer2* mRNA proběhl mezi CT7 a CT12 ( $p<0,01$ ). Hladiny *rPer2* mRNA byly v CT12 významně vyšší než v CT2-9 ( $p<0,01$ ). Navíc v CT10 a CT11 dosahovaly hladiny mRNA výrazně vyšších hodnot než v CT4, CT6 a CT7 ( $p<0,05$ ).

##### Tlusté střevo

Jednoduchá analýza variance prokázala významný vliv času na expresi genu *rPer2* ( $F=4,44$ ;  $p<0,01$ ) (graf 6d).

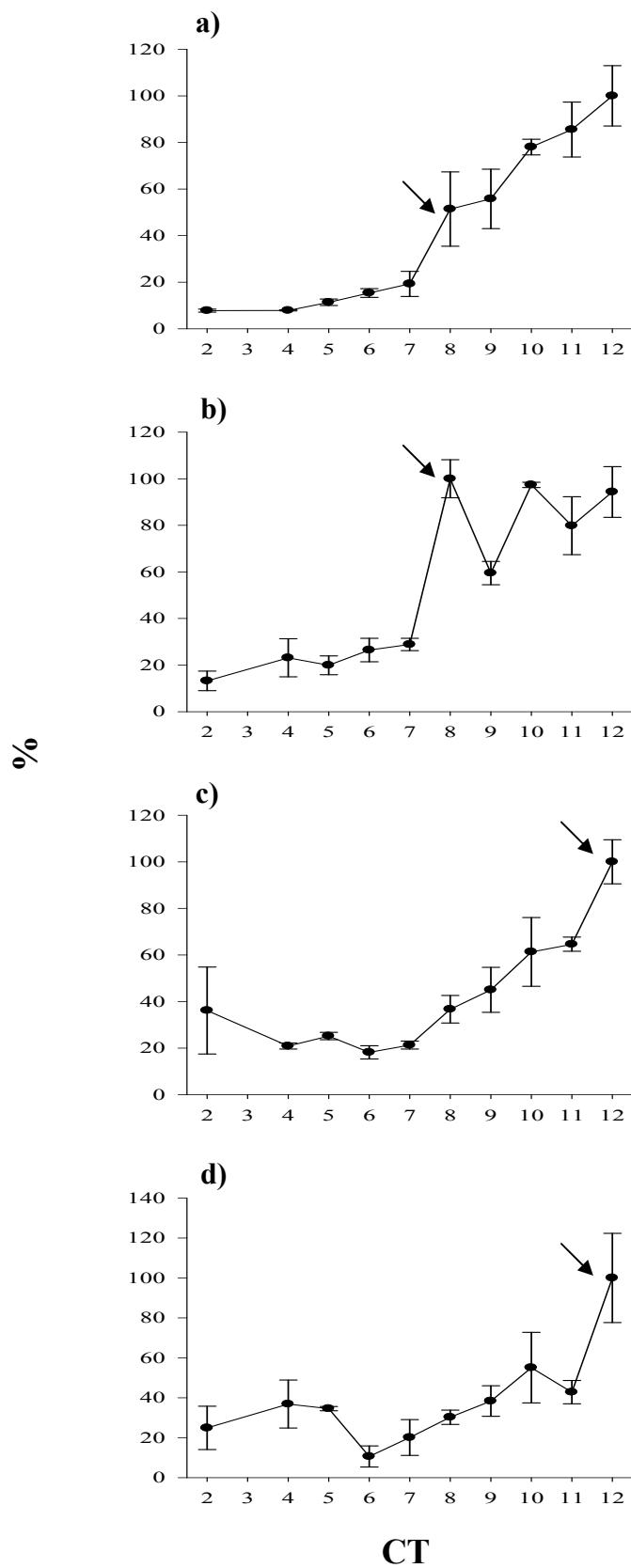
K statisticky nevýznamnému nárůstu a poklesu hladiny mRNA genu došlo mezi CT2 a CT6. Od CT6 do CT10 se exprese *rPer2* pozvolna zvyšovala. K významnému

nárůstu genové exprese došlo mezi CT11 a CT12 ( $p < 0,01$ ). Hladina mRNA byla v CT12 významně vysoká vzhledem ke všem ostatním časovým bodům kromě CT10 ( $p < 0,01$ ).

Pomocí dvojné analýzy variance byly odhaleny významné rozdíly v době nárůstu exprese *rPer2* mezi jednotlivými částmi střeva ( $F=2,8$ ;  $P < 0,01$ ):

Hladiny mRNA *rPer2* stoupaly významně shodně v dvanáctníku i lačníku mezi CT7 a CT8 ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ). V kyčelníku narůstala exprese mezi CT9 a CT12 ( $p < 0,01$ ), podobně jako v tlustém střevu mezi CT10 a CT12 ( $p < 0,01$ ).

## rPer2



**Graf 6:** Porovnání fáze rytmu v expresi hodinového genu *rPer2* v epitelu a) dvanáctníku b) lačnicku c) kyčelníku d) tlustém střevu. Šipka označuje první signifikantní nárůst exprese genu. Na ose x je vyznačen čas (CT), relativní množství mRNA je vyjádřeno v % maximální hodnoty. Dané hodnoty vyjadřují vždy průměr ze tří zvířat  $\pm$  SEM.



#### 4.1.3.3. Exprese *rBmall*

##### Dvanáctník

Jednoduchá analýza variance odhalila významný vliv času na rytmus v expresi genu *rBmall* ( $F=21,97$ ;  $p<0,01$ ) (graf 7a).

Hladina *rBmall* mRNA nabývala nejvyšších hodnot v CT2. K významnému poklesu genové exprese došlo mezi CT2 a CT4 ( $p<0,01$ ). Exprese genu dále postupně klesala až do CT6. Nízkých hladin dosahovala mRNA mezi CT6 a CT12. Gen *rBmall* byl významně více exprimován v CT2 oproti všem ostatním časovým bodům ( $p<0,01$ ). Zároveň byla hladina mRNA významně vyšší v CT4 než v CT6-12 ( $p<0,01$ ).

##### Lačnick

Jednoduchá analýza variance odhalila významný vliv času na expresi genu *rBmall* ( $F=5,39$ ;  $p<0,01$ ) (graf 7b).

Gen *rBmall* byl nejvíce exprimován v CT2. K významnému poklesu hladin mRNA došlo mezi CT2 a CT4. Poté hladiny mRNA kolísaly až postupně klesly na nízké hodnoty v CT8, kterých nabývaly až do CT12. *rBmall* byl více exprimován v CT2-5 oproti všem ostatním časovým bodům ( $p<0,01$ ).

##### Kyčelník

S využitím jednoduché analýzy variance byl odhalen významný vliv času na expresi genu *rBmall* ( $F=7,70$ ;  $p<0,01$ ) (graf 7c).

Hladina *rBmall* mRNA byla vysoká od CT2 do CT5. Výrazný pokles exprese genu nastal mezi CT5 a CT6 ( $p<0,05$ ). Až do CT12 se genová exprese postupně snižovala. Hladiny mRNA dosahovaly významně vyšších hodnot v CT2 a CT5 než v CT6-8 ( $p<0,05$ ) a v CT9-12 ( $p<0,01$ ).

##### Tlusté střevo

Pomocí jednoduché analýzy variance byl prokázán významný vliv času na expresi genu *rBmall* ( $F=4,52$ ;  $p<0,01$ ) (graf 7d).

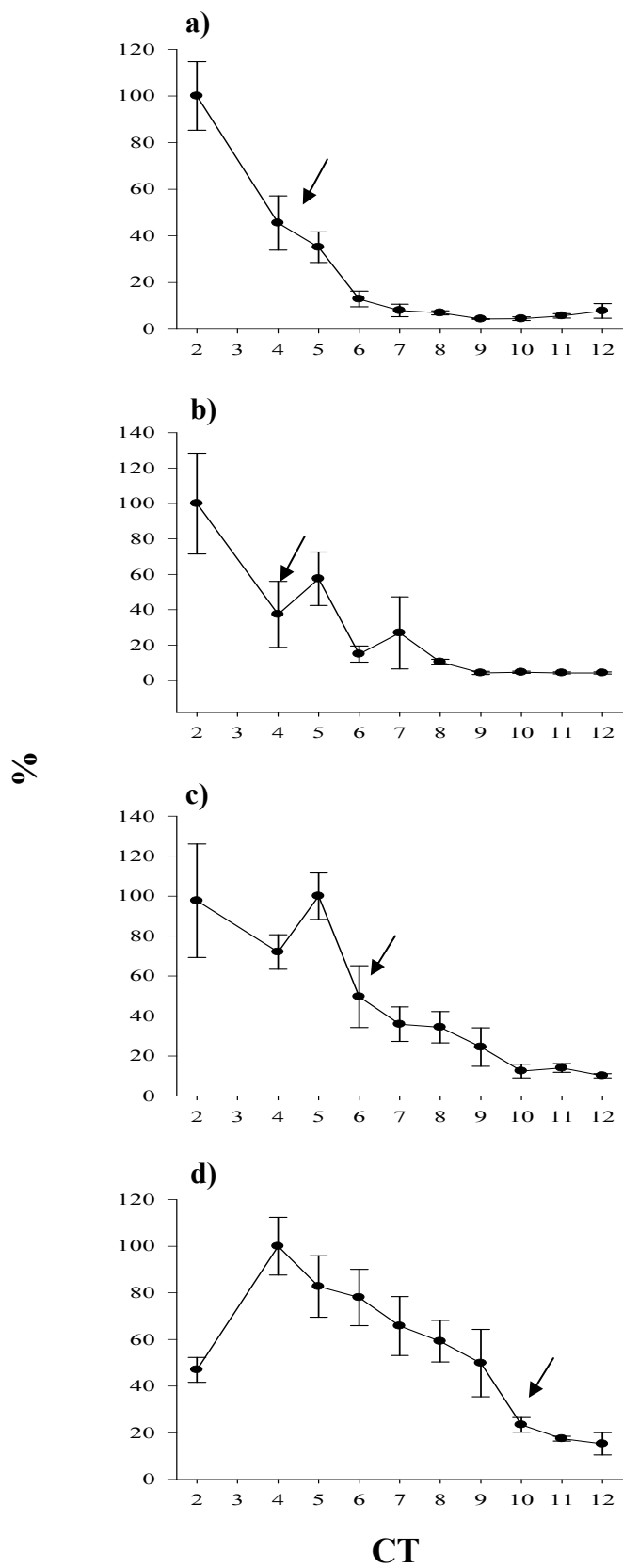
Exprese *rBmall* vzrostla mezi CT2 a CT4. V CT4 byla hladina mRNA nejvyšší. K postupnému poklesu hodnot docházelo od CT4 do CT10 ( $p<0,01$ ). Hladiny mRNA

v CT10-12 byly nízké. Hladina *rBmall* mRNA nabývala významně vyšších hodnot v CT4 než v CT10-12 ( $p<0,01$ ).

Dvojná analýza variance prokázala významné rozdíly v době poklesu exprese *rBmall* mezi jednotlivými částmi střeva ( $F=2,72$ ;  $p<0,01$ ).

Hladiny *rBmall* mRNA shodně klesaly od CT2 do CT4 v dvanáctníku i lačníku ( $p<0,01$ ,  $p<0,05$ ). V kyčelníku docházelo k poklesu exprese mezi CT5 a CT6 ( $p<0,05$ ), zatímco v tlustém střevu teprve od CT4 a CT10 ( $p<0,05$ ).

## rBmal1



**Graf 7:** Porovnání fáze rytmu v expresi hodinového genu *rBmal1* v epitelu a) dvanáctníku b) lačníku c) kyčelníku d) tlustého střeva. Šipka označuje první signifikantní pokles exprese genu. Na ose x je vyznačen čas (CT), relativní množství mRNA je vyjádřeno v % maximální hodnoty. Dané hodnoty vyjadřují vždy průměr ze tří zvířat  $\pm$  SEM.

#### 4.1.3.4. Exprese *rRev-erb-α*

##### Dvanáctník

Jednoduchá analýza variance odhalila významný vliv času na expresi genu *rRev-erb-α* ( $F=5,37$ ;  $p<0,01$ ) (graf 8a).

Expresie genu se zvolna snižovala od CT8 do CT12 ( $p<0,01$ ). Hladiny *rRev-erb-α* byly významně vyšší v CT5, CT6 a CT8 než v CT10-12 ( $p<0,01$ ).

##### Lačník

Jednoduchá analýza variance neprokázala významný vliv času na expresi genu *rRev-erb-α*, rozdíl mezi jednotlivými měřeními nebyl významný ( $F=1,16$ ;  $p=0,3714$ ) (graf 8b).

Přestože je rytmus exprese genu *rRev-erb-α* na grafickém znázornění naznačen, nepodařilo se ho statisticky prokázat. Důvodem je pravděpodobně skutečnost, že exprese *rRev-erb-α* dosahuje v tomto časovém úseku svého maxima a významně se proto nemění.

##### Kyčelník

Pomocí jednoduché analýzy variance byl prokázán významný vliv času na expresi genu *rRev-erb-α* ( $F=8,58$ ;  $p<0,01$ ) (graf 8c).

Ke zvýšení exprese *rRev-erb-α* došlo mezi CT5 a CT6 ( $p<0,01$ ). Mezi CT6 a CT11 dosahovala exprese genu stálých vysokých hodnot. Expresie genu byla významně vyšší v CT6-11 oproti CT2-5 ( $p<0,05$ ).

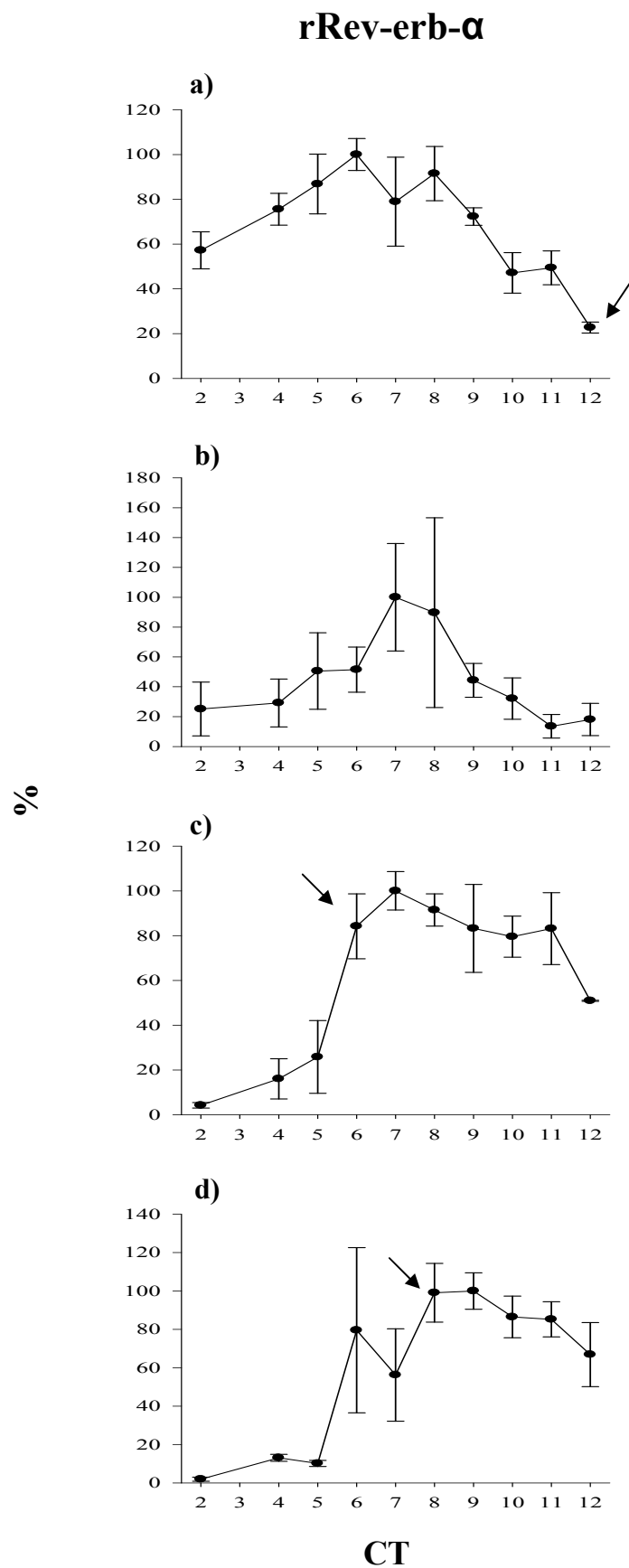
##### Tlusté střevo

S využitím jednoduché analýzy variance byl odhalen významný vliv času na expresi *rRev-erb-α* ( $F=4,55$ ;  $p<0,01$ ) (graf 8d).

Hladiny *rRev-erb-α* mRNA dosahovaly nízkých hodnot mezi CT2-5. Nárůst hladiny *rRev-erb-α* mRNA nastal mezi CT5 a CT8 ( $p<0,05$ ). Poté byly hladiny mRNA až do CT12 vysoké. Hladiny mRNA byly v CT8 a CT9 významně vyšší než v CT2-5 ( $p<0,05$ ).

Dvojná analýza variance odhalila významné rozdíly v době nárůstu/poklesu v expresi *rRev-erb-α* mezi jednotlivými částmi střeva ( $F=1,79$ ;  $p<0,05$ ).

V dvanáctníku hladiny *rRev-erb-α* mRNA klesaly mezi CT8 a CT12 ( $p<0,05$ ). V lačníku nebyl statisticky prokázán významný vliv času na expresi genu. V kyčelníku došlo k nárůstu exprese genu mezi CT5 a CT6 ( $p<0,05$ ) a v tlustém střevu od CT5 do CT8 ( $p<0,05$ ).



**Graf 8:** Porovnání fáze rytmu v expresi hodinového genu *rRev-erb- $\alpha$*  v epitelu a) dvanáctníku b) lačnicku c) kyčelníku d) tlustém střevu. Šipka označuje první signifikantní nárůst/pokles exprese genu. Na ose x je vyznačen čas (CT), relativní množství mRNA je vyjádřeno v % maximální hodnoty. Dané hodnoty vyjadřují vždy průměr ze tří zvířat  $\pm$  SEM.

#### 4.1.4. Exprese genu *rWeel* v dvanáctníku a tlustém střevu během 24 hodin

V této části diplomové práce jsme se pokusili zjistit, zda exprese genu *rWeel* vykazuje cirkadiánní rytmus v dvanáctníku a tlustém střevu. Studována byla kromě *rWeel* také exprese tzv. „housekeeping genu“ *rβ-2 mikroglobulinu*, který byl použit jako normalizátor. Získaná data byla kvantifikována relativně. Pro statistické hodnocení změn hladin mRNA v čase byla použita jednoduchá analýza variance a následný Student-Newman-Keulsův test.

##### Dvanáctník

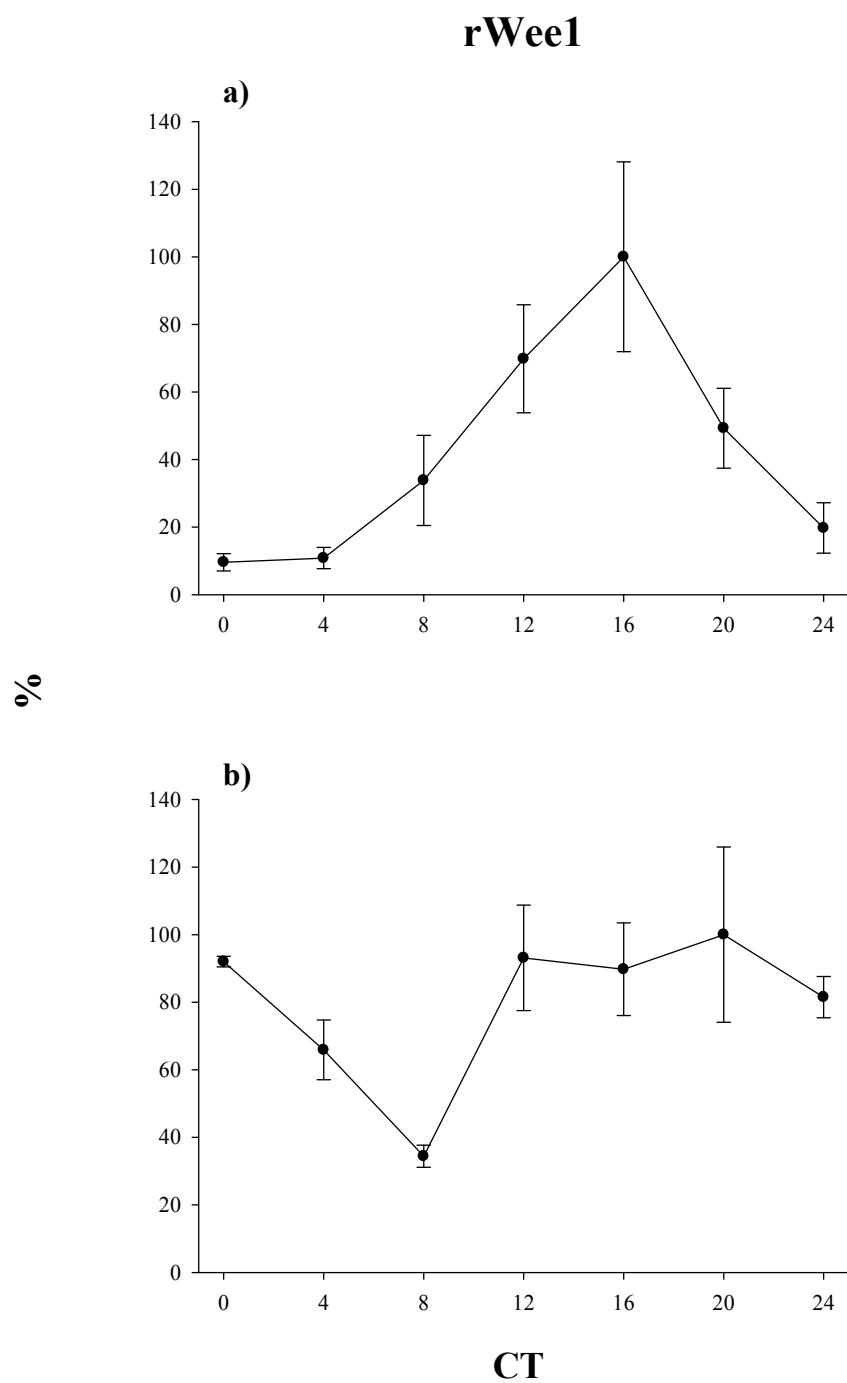
Jednoduchá analýza variance odhalila významný vliv času na expresi genu *rWeel* ( $F=5,410$ ;  $p<0,01$ ) (graf 9a).

V CT0 a CT4 se hladiny *rWeel* mRNA pohybovaly na nízkých hodnotách. K významnému nárůstu exprese genu došlo mezi CT8 a CT16 ( $p<0,05$ ). V CT16 dosahovala *rWeel* mRNA maximálních hodnot. Mezi CT16 a CT24 došlo k poklesu exprese *rWeel* ( $p<0,01$ ). V CT24 se hladiny mRNA pohybovaly na nízkých hodnotách stejně jako v CT0 a CT4. Hladina *rWeel* mRNA byla významně vyšší v CT16 v porovnání s CT0, CT4, CT24 ( $p<0,01$ ) a CT8 ( $p<0,05$ ).

##### Tlusté střevo

Jednoduchá analýza variance odhalila významný vliv času na expresi genu *rWeel* ( $F=6,971$ ;  $p<0,05$ ) (graf 9b).

Mezi CT0 a CT8 došlo k významnému poklesu hladin *rWeel* mRNA ( $p<0,05$ ). Od CT8 do CT12 exprese daného genu výrazně rostla ( $p<0,05$ ). Od CT12 do CT24 se hladiny mRNA pohybovaly na vysokých hodnotách. Exprese *rWeel* byla významně nižší v CT8 než v CT4 a CT12-24 ( $p<0,05$ ).



**Graf 9:** Porovnání profilů exprese genu *rWeel* během 24 hodin v epitelu a) dvanáctníku b) tlustého střeva. Na ose x je vyznačen čas (CT), relativní množství mRNA je vyjádřeno v % maximální hodnoty. Dané hodnoty vyjadřují vždy průměr ze tří zvířat  $\pm$  SEM.



#### 4.1.5. Exprese genu *rWeel* v dvanáctníku a tlustém střevu během 12 hodin

V této části diplomové práce byly sledovány detailní 12-hodinové profily exprese genu *rWeel* ve snaze porovnat fázi rytmické exprese tohoto genu v dvanáctníku a tlustém střevu. Studována byla kromě genu *rWeel* také exprese tzv. „housekeeping genu“ *rβ-2 mikroglobulinu*, který byl použit jako normalizátor. Získaná data byla kvantifikována relativně. Pro statistické hodnocení změn hladin mRNA v čase byla použita jednoduchá analýza variance a následný Student-Newman-Keulsův test. Pro stanovení statistické významnosti rozdílů rytmu mezi dvanáctníkem a tlustým střevem byla použita dvojná analýza variance s následným Student-Newman-Keulsovým testem.

##### Dvanáctník

Pomocí jednoduché analýzy variance byl odhalen významný vliv času na expresi genu *rWeel* ( $F=18,808$ ;  $p<0,01$ ) (graf 10a).

Exprese genu *rWeel* dosahovala nízkých hodnot mezi CT2 a CT5. K mírnému nárůstu na střední hladiny *rWeel* mRNA došlo mezi CT5 a CT6 ( $p<0,05$ ). Na středních hodnotách se hladiny mRNA pohybovaly do CT9. K výraznému nárůstu exprese genu *rWeel* došlo mezi CT9 a CT11 ( $p<0,01$ ). Maximální hodnoty byly dosaženy v CT11. Hladiny *rWeel* mRNA byly významně vyšší v CT10-12 než v CT2-5 ( $p<0,01$ ) a CT6-9 ( $p<0,01$ ). Zároveň byla exprese genu vyšší v CT6-8 v porovnání s CT2-5 ( $p<0,05$ ).

##### Tlusté střevo

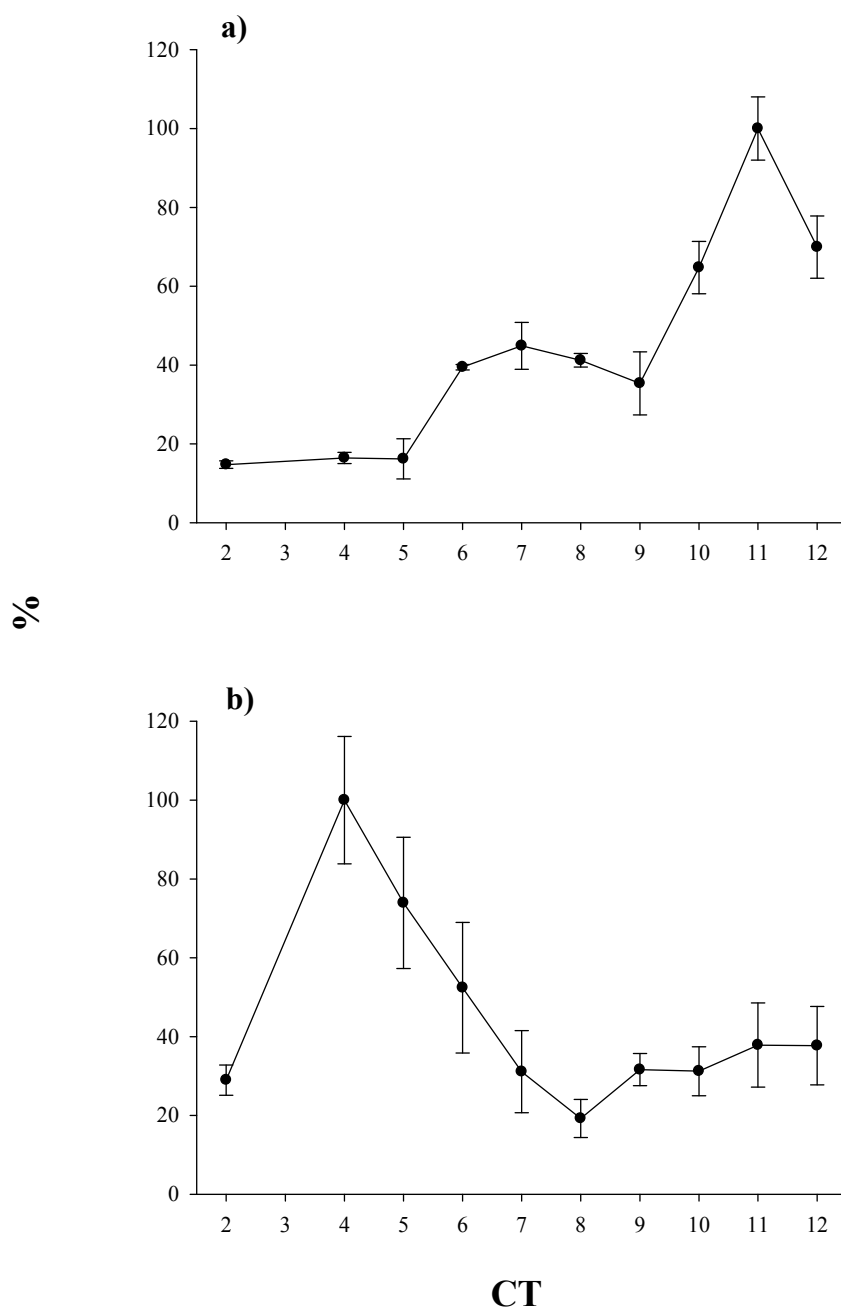
S využitím jednoduché analýzy variance byl prokázán významný vliv času na expresi genu *rWeel* ( $F=3,941$ ;  $p<0,05$ ) (graf 10b).

K významnému nárůstu hladin *rWeel* mRNA došlo mezi CT2 a CT4 ( $p<0,05$ ). V CT4 dosahovala exprese genu nejvyšších hodnot. Pokles z vysokých hodnot nastal mezi CT4 a CT8 ( $p<0,01$ ). Od CT9 do CT12 nabývaly hladiny mRNA zhruba středních hodnot. Hladina *rWeel* mRNA byla významně vyšší v CT4 oproti CT8 ( $p<0,01$ ) a CT2, CT7, CT9-12 ( $p<0,05$ ). Zároveň hodnoty v CT5 nabývaly významně vyšších hodnot než v CT8 ( $p<0,05$ ).

Dvojná analýza variance odhalila významné rozdíly v době nárůstu/poklesu exprese *rWeel* mezi dvanáctníkem a tlustým střevem ( $F=10,043$ ;  $P<0,01$ ).

V dvanáctníku hladina *rWeel* mRNA narůstala mezi CT5 a CT6 ( $p<0,05$ ), mezi CT9 a CT10 ( $p<0,01$ ) a také mezi CT10 a CT11 ( $p<0,01$ ). Naopak v tlustém střevu exprese *rWeel* klesala mezi CT4 a CT7 ( $p<0,05$ ).

## rWeel



**Graf 10:** Porovnání profilů exprese genu *rWeel* během 12 hodin v epitelu a) dvanáctníku b) tlustého střeva. Na ose x je vyznačen čas (CT), relativní množství mRNA je vyjádřeno v % maximální hodnoty. Dané hodnoty vyjadřují vždy průměr ze tří zvířat  $\pm$  SEM.

## 4.2. Vývoj rytmické exprese hodinových genů v epitelu tlustého střeva

V této části diplomové práce jsme se pokusili popsat vývoj rytmické exprese hodinových genů v tlustém střevu laboratorního potkana během ontogenetického vývoje. Studována byla exprese hodinových genů *rPer1*, *rPer2*, *rBmal1*, *rRev-erb-α*, *rClock*, *rCry1* a tzv. „housekeeping genu“ *rβ-2 mikroglobulinu*, který byl použit jako normalizátor. Profily exprese uvedených genů byly sledovány u 20-denních embryí, 2-, 10-, 20- a 30-denních mlád'at. Získaná data byla kvantifikována relativně. Pro statistické hodnocení změn hladin mRNA v čase byla použita jednoduchá analýza variance a následný Student-Newman-Keulsův test.

### 4.2.1. Vývoj exprese *rPer1*

#### 20-denní embrya

Jednoduchá analýza variance odhalila významný vliv času na expresi genu *rPer1* ( $F=3,436$ ;  $p<0,05$ ) (graf 11a).

Expresi genu *rPer1* zvolna rostla ze středních hodnot v CT4 na nejvyšší hladinu v CT12. K mírnému poklesu hladin *rPer1* mRNA došlo mezi CT12 a CT20. Pokles hodnot pokračoval až do CT24. Hladiny mRNA nabývaly významně vyšších hodnot v CT8 a CT12 vůči CT24 ( $p<0,05$ ).

#### 2-denní mlád'ata

Jednoduchá analýza variance neodhalila významný vliv času na expresi genu *rPer1*. Rozdíl mezi jednotlivými měřeními nebyl významný ( $F=0,944$ ;  $p=0,488$ ) (graf 11b).

Rytmus exprese genu *rPer1* s nízkou amplitudou je na grafickém znázornění naznačen, přesto se jej nepodařilo pomocí statistiky prokázat. Důvodem jsou pravděpodobně větší rozptyly naměřené v časových bodech CT4, CT8 a CT24.

### 10-denní mládřata

Pomocí jednoduché analýzy variance byl prokázán významný vliv času na expresi genu *rPer1* ( $F=3,912$ ;  $p<0,05$ ) (graf 11c).

Hladiny *rPer1* mRNA pozvolna klesaly mezi CT24 a CT12 ( $p<0,05$ ), byly nízké v CT12-16 a od CT16 docházelo k postupnému nárůstu exprese genu zpět přes střední hodnoty až na nejvyšší hodnoty v CT24 ( $p<0,05$ ).

### 20-denní mládřata

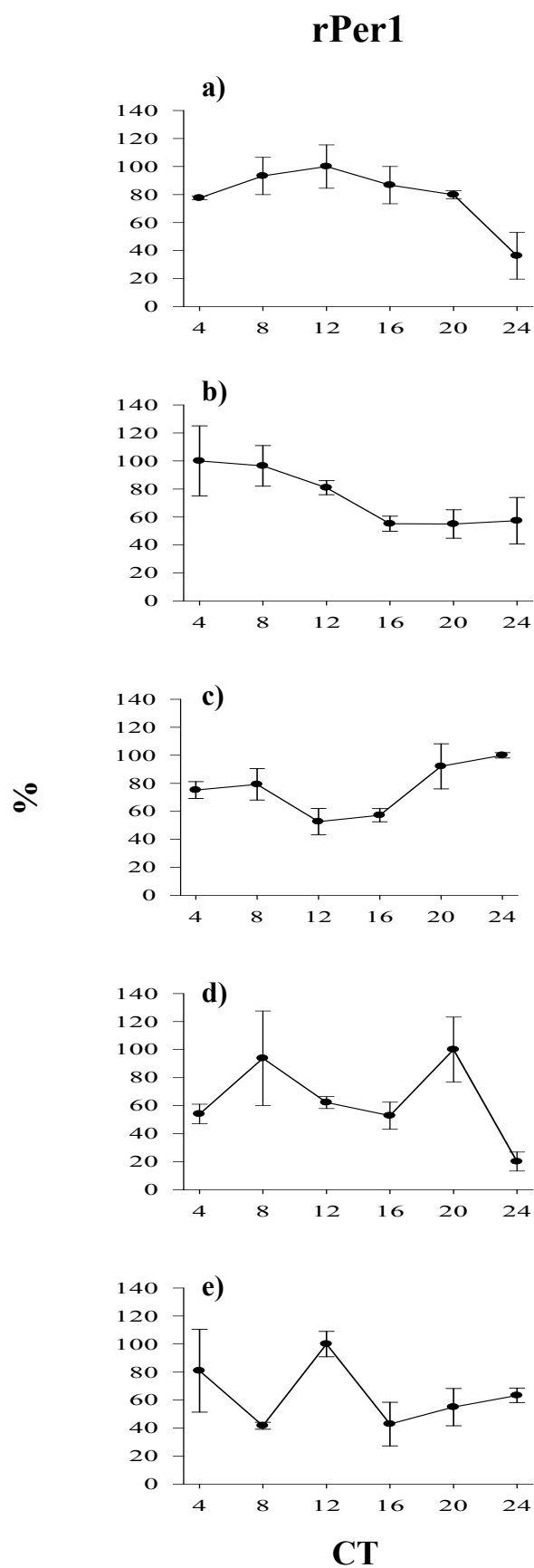
Pomocí jednoduché analýzy variance byl odhalen významný vliv času na expresi genu *rPer1* ( $p<0,05$ ) (graf 11d).

Hladiny *rPer1* mRNA rostly od CT24 do CT4 ( $p<0,05$ ). Pokles hodnot nastal mezi CT20 a CT24 ( $p<0,05$ ). Hladina mRNA dosahovala významně nižších hodnot v CT24 než ve všech ostatních časových bodech ( $p<0,05$ ).

### 30-denní mládřata

Jednoduchá analýza variance neprokázala významný vliv času na expresi genu *rPer1*. Rozdíl mezi jednotlivými časovými body nebyl významný ( $F=2,223$ ;  $p=0,119$ ) (graf 11e).

Rytmická exprese genu *rPer1* je na grafickém znázornění naznačena, nepodařilo se ji však statisticky prokázat. Důvodem jsou pravděpodobně velké rozptyly naměřené v časových bodech CT4, CT16 a CT20.



**Graf 11:** Vývoj rytmické exprese hodinového genu *rPer1* v epitelu tlustého střeva. Sledovány byly 24-hodinové profily exprese studovaného genu u a) 20-denních embryí b) 2-denních mláďat c) 10-denních mláďat d) 20-denních mláďat e) 30-denních mláďat. Na ose x je vyznačen čas (CT), relativní množství mRNA je vyjádřeno v % maximální hodnoty. Dané hodnoty vyjadřují vždy průměr ze tří zvířat  $\pm$  SEM.

### 4.2.2. Vývoj exprese *rPer2*

#### 20-denní embrya

Jednoduchá analýza variance odhalila významný vliv času na expresi genu *rPer2* ( $F=3,585$ ;  $p<0,05$ ) (graf 12a).

Hladiny *rPer2* mRNA se postupně zvyšovaly ze středních hodnot v CT24 až na maximum v CT12 ( $p<0,05$ ). K poklesu hladin *rPer2* mRNA došlo mezi CT12 a CT24 ( $p<0,05$ ).

#### 2-denní mládřata

Jednoduchá analýza variance odhalila významný vliv času na expresi genu *rPer2* ( $F=5,607$ ;  $p<0,01$ ) (graf 12b).

Hladiny *rPer2* mRNA zvolna narůstaly mezi CT24 a CT8 ( $p<0,05$ ). Nejvíce byl gen exprimován v CT8-12. K poklesu hladin *rPer2* mRNA došlo mezi CT12 a CT16 ( $p<0,05$ ). V CT16-24 byla exprese genu trvale na středních hodnotách. Exprese genu byla významně vyšší v CT8 a CT12 než v CT16 a CT24 ( $p<0,05$ ).

#### 10-denní mládřata

Pomocí jednoduché analýzy variance nebyl prokázán významný vliv času na rytmickou expresi genu *rPer2*. Rozdíl mezi jednotlivými měřeními nebyl významný ( $F=1,291$ ;  $p=0,330$ ) (graf 12c).

Přestože je rytmus exprese genu *rPer2* na grafickém znázornění naznačen, nepodařilo se ho statisticky prokázat. Důvodem jsou pravděpodobně větší rozptyly naměřené v časových bodech CT4, CT8 a CT12.

#### 20-denní mládřata

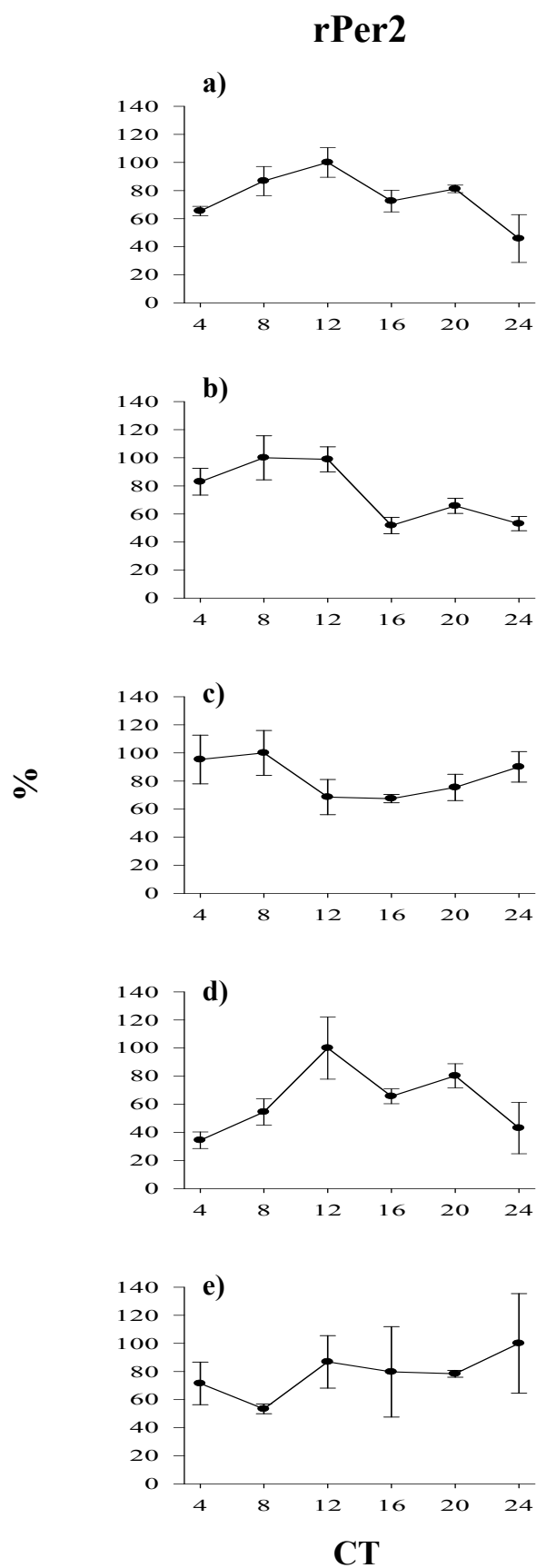
S využitím jednoduché analýzy variance byl odhalen významný vliv času na expresi genu *rPer2* ( $F=3,389$ ;  $p<0,05$ ) (graf 12d).

K významnému nárůstu exprese genu došlo mezi CT4 a CT12 ( $p<0,05$ ). Hladiny *rPer2* mRNA pak postupně klesaly mezi CT12 a CT4 ( $p<0,05$ ).

### **30-denní mláďata**

Jednoduchá analýza variance neodhalila vliv času na expresi genu *rPer2*. Rozdíl mezi jednotlivými časovými body nebyl významný ( $F=0,460$ ;  $p=0,798$ ) (graf 12e).





**Graf 12:** Vývoj rytmické exprese hodinového genu *rPer2* v epitelu tlustého střeva. Sledovány byly 24-hodinové profily exprese studovaného genu u a) 20-denních embryí b) 2-denních mláďat c) 10-denních mláďat d) 20-denních mláďat e) 30-denních mláďat. Na ose x je vyznačen čas (CT), relativní množství mRNA je vyjádřeno v % maximální hodnoty. Dané hodnoty vyjadřují vždy průměr ze tří zvířat  $\pm$  SEM.

### 4.2.3. Vývoj exprese *rBmall*

#### 20-denní embrya

Jednoduchá analýza variance neprokázala vliv času na expresi genu *rBmall*. Rozdíl mezi jednotlivými měřeními nebyl významný ( $F=2,176$ ;  $p=0,125$ ) (graf 13a).

#### 2-denní mládřata

Pomocí jednoduché analýzy variance nebyl odhalen významný vliv času na rytmickou expresi genu *rBmall*. Rozdíl mezi jednotlivými časovými body nebyl významný ( $F=0,938$ ;  $p=0,491$ ) (graf 13b).

#### 10-denní mládřata

S využitím jednoduché analýzy variance nebyl prokázán významný vliv času na rytmus v expresi genu *rBmall*. Rozdíl mezi jednotlivými měřeními nebyl významný ( $F=2,355$ ;  $p=0,104$ ) (graf 13c).

#### 20-denní mládřata

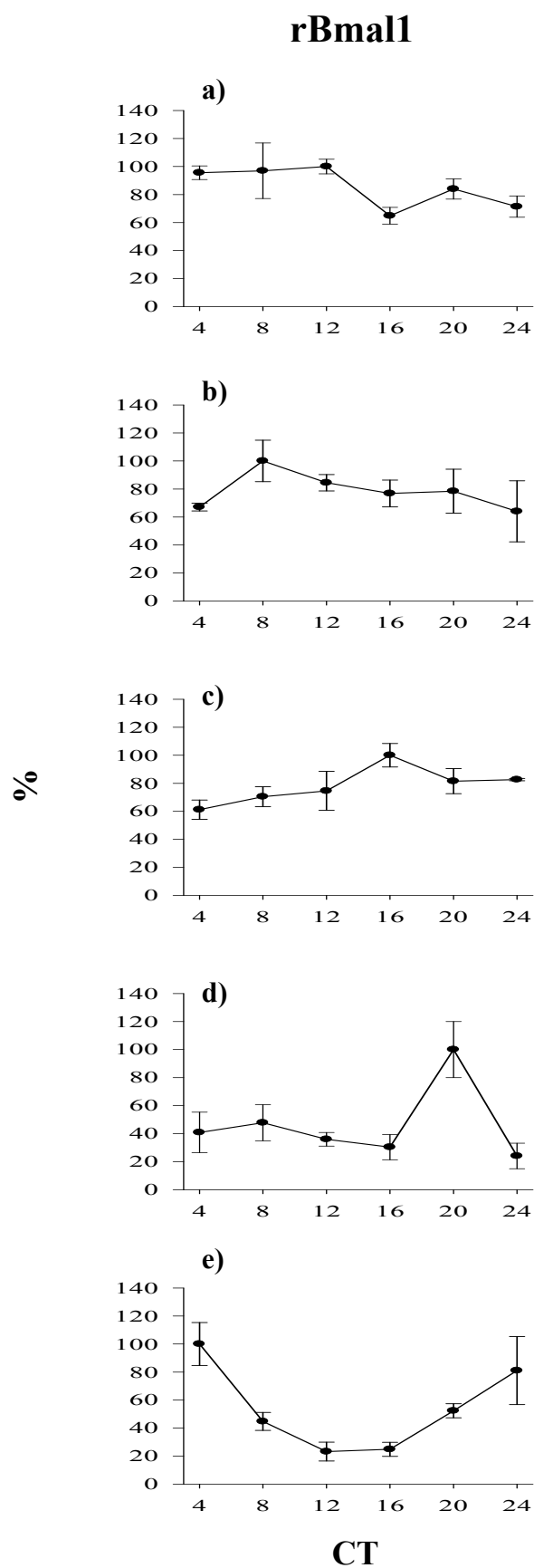
Jednoduchá analýza variance odhalila významný vliv času na expresi genu *rBmall* ( $F=4,687$ ;  $p<0,05$ ) (graf 13d).

Hladiny *rBmall* mRNA dosahovaly zhruba středních hodnot v CT4-16. K významnému zvýšení exprese genu došlo mezi CT16 a CT20 ( $p<0,05$ ). Nejvíce byl gen exprimován v CT20. Pokles hladin *rBmall* mRNA nastal mezi CT20 a CT24 ( $p<0,05$ ). Exprese genu byla významně vyšší v CT20 vůči všem ostatním časovým bodům ( $p<0,05$ ).

#### 30-denní mládřata

Jednoduchá analýza variance odhalila významný vliv času na expresi genu *rBmall* ( $F=5,910$ ;  $p<0,01$ ) (graf 13e).

K významnému poklesu hodnot došlo mezi CT4 a CT8 ( $p<0,05$ ). Exprese genu *rBmall* dosahovala nižších hodnot mezi CT8-CT16. K prudkému nárůstu hladin *rBmall* mRNA došlo mezi CT16 a CT24 ( $p<0,05$ ). Exprese genu *rBmall* byla v CT4 významně vyšší než v CT8 ( $p<0,05$ ) a v CT12-16 ( $p<0,01$ ). Zároveň dosahovala hladina mRNA vyšších hodnot v CT24 oproti CT12-16 ( $p<0,05$ ).



**Graf 13:** Vývoj rytmické exprese hodinového genu *rBmal1* v epitelu tlustého střeva. Sledovány byly 24-hodinové profily exprese studovaného genu u a) 20-denních embryí b) 2-denních mláďat c) 10-denních mláďat d) 20-denních mláďat e) 30-denních mláďat. Na ose x je vyznačen čas (CT), relativní množství mRNA je vyjádřeno v % maximální hodnoty. Dané hodnoty vyjadřují vždy průměr ze tří zvířat  $\pm$  SEM.

#### 4.2.4. Vývoj exprese *rRev-erb-α*

##### 20-denní embrya

Pomocí jednoduché analýzy variance nebyl odhalen významný vliv času na rytmickou expresi genu *rRev-erb-α*. Rozdíl mezi jednotlivými měřeními nebyl významný ( $F=2,574$ ;  $p=0,083$ ) (graf 14a).

Přestože je rytmus exprese genu *rRev-erb-α* na grafickém znázornění jasně naznačen, nepodařilo se ho statisticky prokázat. Důvodem jsou pravděpodobně velké rozptyly naměřené v časových bodech CT8 a CT12.

##### 2-denní mládřata

Jednoduchá analýza variance neodhalila vliv času na expresi genu *rRev-erb-α*. Rozdíl mezi jednotlivými časovými body nebyl významný ( $F=2,315$ ;  $p=0,108$ ) (graf 14b).

##### 10-denní mládřata

Jednoduchá analýza variance neprokázala vliv času na expresi genu *rRev-erb-α*. Naměřené hodnoty těsně nesplnily kritéria pro významnost statistické analýzy ( $F=2,912$ ;  $p=0,060$ ) (graf 14c).

Rytmus v expresi genu *rRev-erb-α* je na grafickém znázornění zřetelný, přesto se ho nepodařilo statisticky dokázat. Důvodem jsou pravděpodobně velké rozptyly naměřené v časovém bodě CT24.

##### 20-denní mládřata

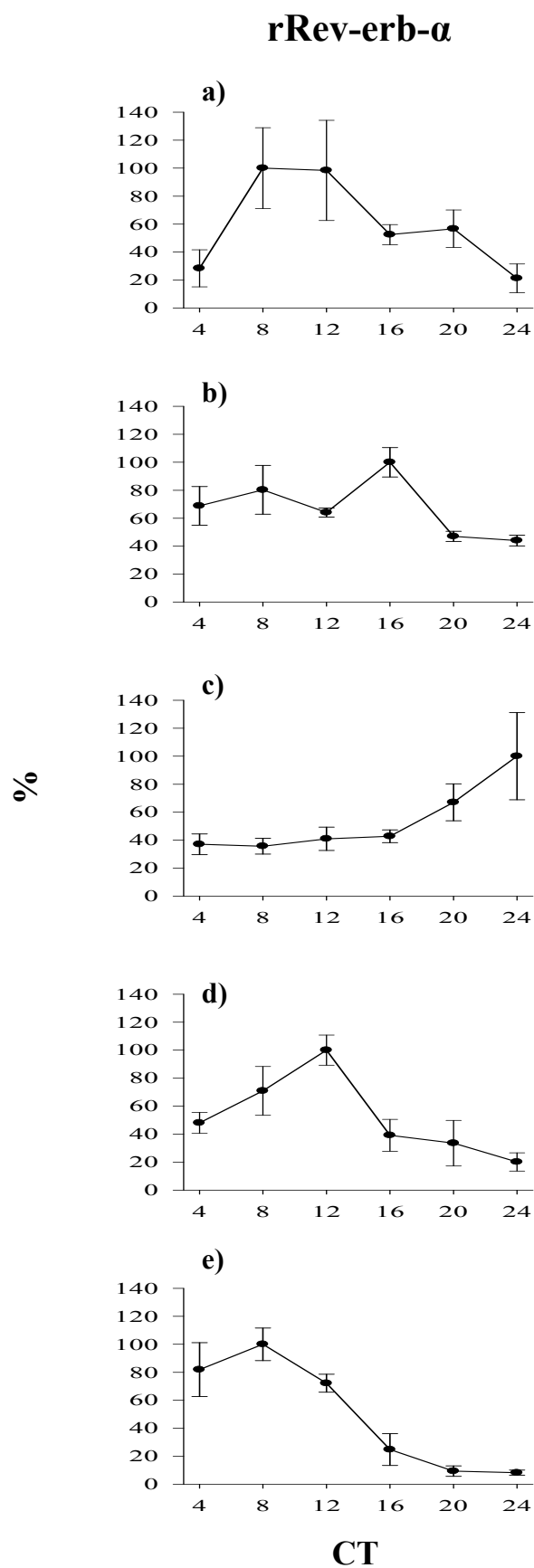
S využitím jednoduché analýzy variance byl odhalen vliv času na expresi genu *rRev-erb-α* ( $F=5,527$ ;  $p<0,01$ ) (graf 14d).

K významnému nárůstu exprese *rRev-erb-α* došlo mezi CT4 a CT12 ( $p<0,05$ ). Maximálních hodnot dosahoval exprimovaný gen v CT12. Významný pokles hodnot nastal mezi CT12 a CT16 ( $p<0,05$ ). Od CT16 zvolna klesaly hladiny mRNA na nejnižší hodnotu v CT24. Hladina *rRev-erb-α* mRNA byla významně vyšší v CT12 oproti CT16-24 a CT4 ( $p<0,05$ ).

### 30-denní mláďata

Pomocí jednoduché analýzy variance byl odhalen významný vliv času na expresi genu *rRev-erb-α* ( $F=13,936$ ;  $p<0,01$ ) (graf 14e).

K významnému nárůstu exprese *rRev-erb-α* došlo mezi CT24 a CT4 ( $p<0,01$ ). Vysoké hladiny trvaly do CT8, kdy byl gen exprimován nejvíce. Významný pokles hodnot nastal mezi CT8 a CT16 ( $p<0,01$ ). V CT20 a CT24 byly hladiny mRNA daného genu nízké. Hladiny *rRev-erb-α* mRNA byly významně vyšší v CT4-12 vůči CT16-24 ( $p<0,01$ ).



**Graf 14:** Vývoj rytmické exprese hodinového genu *rRev-erb- $\alpha$*  v epitelu tlustého střeva. Sledovány byly 24-hodinové profily exprese studovaného genu u a) 20-denních embryí b) 2-denních mláďat c) 10-denních mláďat d) 20-denních mláďat e) 30-denních mláďat. Na ose x je vyznačen čas (CT), relativní množství mRNA je vyjádřeno v % maximální hodnoty. Dané hodnoty vyjadřují vždy průměr ze tří zvířat  $\pm$  SEM.

#### 4.2.5. Vývoj exprese *rClock*

##### 20-denní embrya

S využitím jednoduché analýzy variance byl odhalen významný vliv času na expresi genu *rClock* ( $F=4,098$ ;  $p<0,05$ ) (graf 15a).

Ačkoliv byl vliv času významný, profil exprese neodpovídal cirkadiánní variaci naměřených hodnot. Hladina mRNA byla významně vyšší v CT12 oproti CT24 ( $p<0,05$ ).

##### 2-denní mláďata

Jednoduchá analýza variance neodhalila vliv času na expresi genu *rClock*. Rozdíl mezi jednotlivými časovými body nebyl významný ( $F=0,895$ ;  $p=0,515$ ) (graf 15b).

##### 10-denní mláďata

Jednoduchá analýza variance neprokázala vliv času na expresi genu *rClock*. Rozdíl mezi jednotlivými měřeními nebyl významný ( $F=0,114$ ;  $p=0,987$ ) (graf 15c).

##### 20-denní mláďata

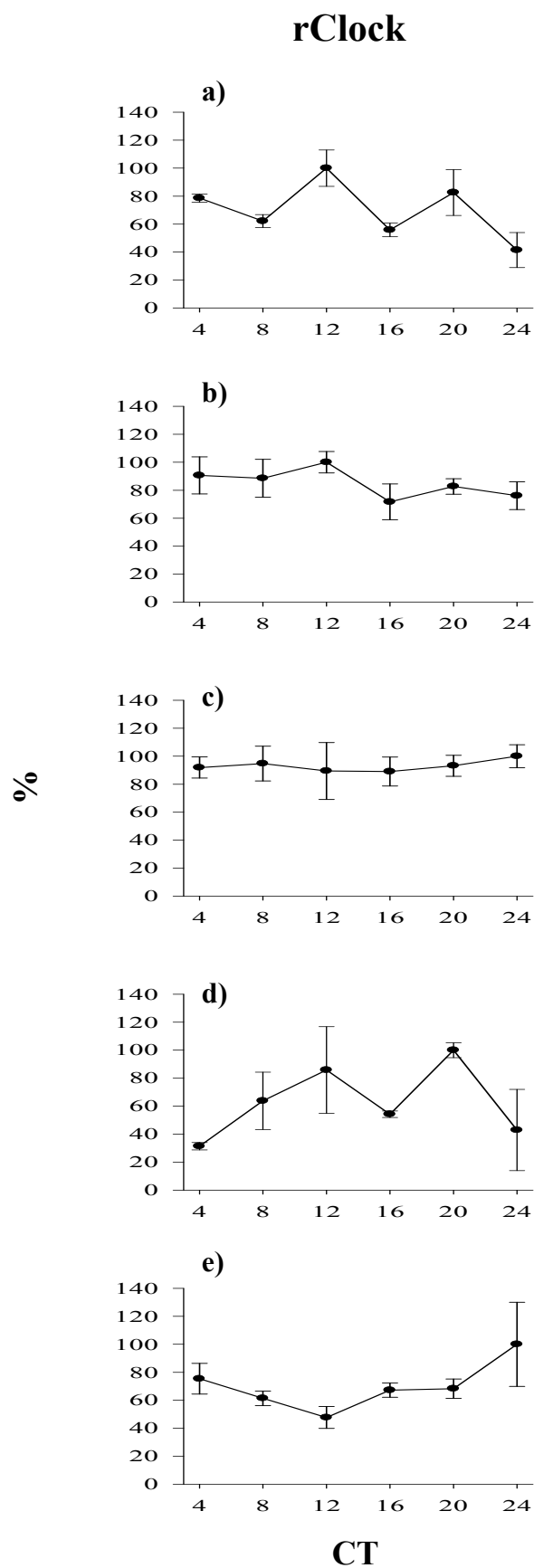
Pomocí jednoduché analýzy variance nebyl odhalen významný vliv času na expresi genu *rClock*, rozdíl mezi jednotlivými měřeními nebyl významný ( $p=0,154$ ) (graf 15d).

Rytmus v expresi genu *rClock* je na grafickém znázornění naznačen, přesto se ho nepodařilo statisticky prokázat. Důvodem jsou pravděpodobně velké rozptyly naměřené v časových bodech CT12 a CT24.

##### 30-denní mláďata

Jednoduchá analýza variance neprokázala rytmus v expresi genu *rClock*. Naměřené hodnoty nesplnily kritéria pro významnost statistické analýzy ( $p=0,367$ ) (graf 15e).

Přestože je rytmus exprese genu *rClock* na grafickém znázornění mírně naznačen, nepodařilo se ho statisticky dokázat. Důvodem jsou pravděpodobně velké rozptyly zjištěné v časovém bodě CT24.



**Graf 15:** Vývoj rytmické exprese hodinového genu *rClock* v epitelu tlustého střeva. Sledovány byly 24-hodinové profily exprese studovaného genu u a) 20-denních embryí b) 2-denních mláďat c) 10-denních mláďat d) 20-denních mláďat e) 30-denních mláďat. Na ose x je vyznačen čas (CT), relativní množství mRNA je vyjádřeno v % maximální hodnoty. Dané hodnoty vyjadřují vždy průměr ze tří zvířat  $\pm$  SEM.



#### 4.2.6. Vývoj exprese *rCryI*

##### 20-denní embrya

Jednoduchá analýza variance neodhalila vliv času na expresi genu *rCryI*. Rozdíl mezi jednotlivými měřeními nebyl významný ( $F=1,716$ ;  $p=0,205$ ) (graf 16a).

##### 2-denní mládřata

S využitím jednoduché analýzy variance byl prokázán významný vliv času na expresi genu *rCryI* ( $F=3,442$ ;  $p<0,05$ ) (graf 16b).

Hladiny *rCryI* mRNA pozvolna klesaly mezi CT4 a CT8 a také mezi CT12-24 ( $p<0,05$ ). Exprese genu se naopak zvyšovala mezi CT24 a CT12 ( $p<0,05$ ).

##### 10-denní mládřata

Pomocí jednoduché analýzy variance nebyl odhalen vliv času na expresi genu *rCryI*, rozdíl mezi jednotlivými časovými body nebyl významný ( $F=1,084$ ;  $p=0,417$ ) (graf 16c).

##### 20-denní mládřata

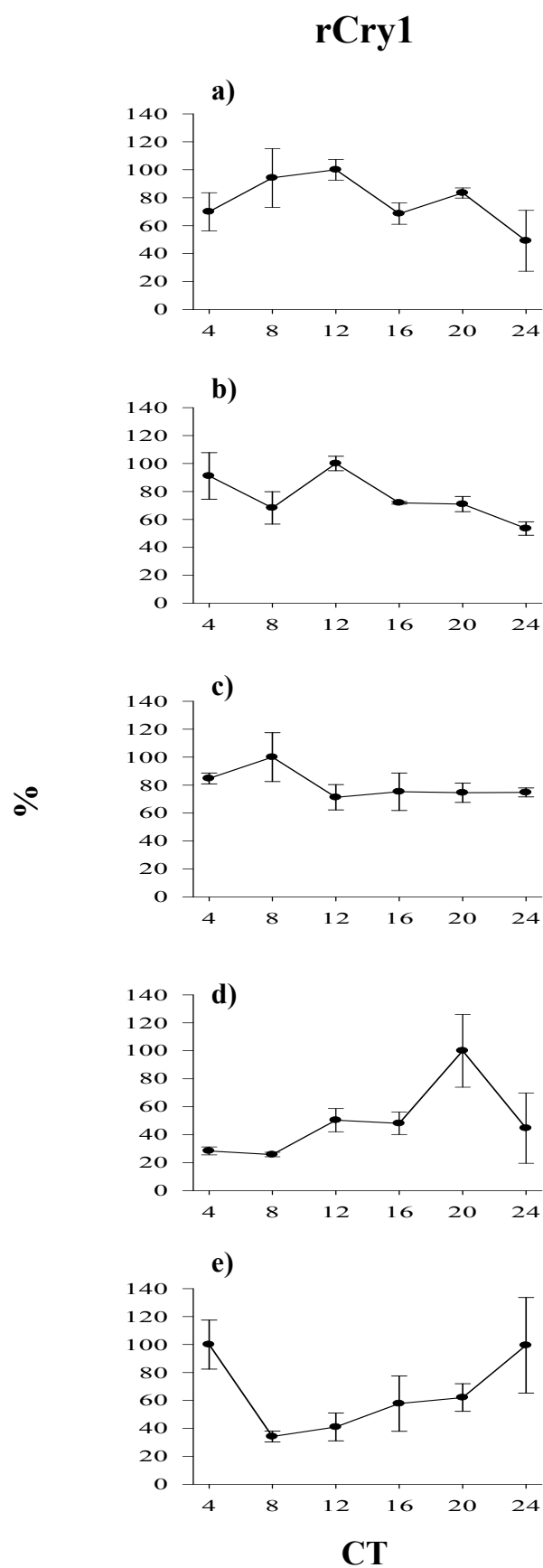
Jednoduchá analýza variance neprokázala vliv času na expresi genu *rCryI*. Naměřené hodnoty těsně nesplnily kritéria pro statistickou analýzu ( $F=2,960$ ;  $p=0,057$ ) (graf 16d).

Přestože je rytmus exprese genu *rCryI* na grafickém znázornění zřetelný, nepodařilo se ho statisticky prokázat. Důvodem jsou pravděpodobně velké rozptyly zjištěné v časových bodech CT20 a CT24.

##### 30-denní mládřata

Pomocí jednoduché analýzy variance nebyl odhalen vliv času na expresi genu *rCryI*. Rozdíl mezi naměřenými hodnotami nebyl významný ( $F=2,300$ ;  $p=0,110$ ) (graf 16e).

Rytmus v expresi genu *rCryI* je na grafickém znázornění naznačen, přesto se ho nepodařilo statisticky prokázat. Důvodem jsou pravděpodobně velké rozptyly naměřené v časových bodech CT4 a CT24.



**Graf 16:** Vývoj rytmické exprese hodinového genu *rCry1* v epitelu tlustého střeva. Sledovány byly 24-hodinové profily exprese studovaného genu u a) 20-denních embryí b) 2-denních mláďat c) 10-denních mláďat d) 20-denních mláďat e) 30-denních mláďat. Na ose x je vyznačen čas (CT), relativní množství mRNA je vyjádřeno v % maximální hodnoty. Dané hodnoty vyjadřují vždy průměr ze tří zvířat  $\pm$  SEM.

## 5. DISKUZE

### 5.1. Exprese hodinových genů a genu *rWeel* v epitelu jednotlivých částí střeva potkana

V předkládané diplomové práci byla prokázána rytmická cirkadiánní exprese hodinových genů v epiteliálních buňkách jednotlivých částí trávicího systému laboratorního potkana (dvanáctník, lačník, kyčelník, tlusté střevo). Zároveň byly prokázány rytmické změny hladin proteinů rPER1 a rBMAL1, jejichž přítomnost byla lokalizována v epiteliálních buňkách krypt kolorektální části tlustého střeva. Tento výsledek byl prvním důkazem, že epiteliální buňky střeva laboratorního potkana obsahují funkční cirkadiánní hodiny (Sládek *et al.* 2007). Při sledování 24-hodinových profilů byla ve všech sledovaných částech střeva zjištěna rytmická exprese genů *rPer1*, *rBmal1* a *rRev-erb-α*. Rytmus v expresi námi sledovaných hodinových genů byl ve střevě opožděn zhruba o 8 hodin v porovnání s SCN, pouze rytmus v expresi *rRev-erb-α* byl vůči SCN opožděn jen o 4 hodiny (Reppert et Weaver 2001). Gen *rPer2* vykazoval rytmus v expresi v dvanáctníku, lačnicku a tlustém střevu, pouze v kyčelníku nebyla těsně splněna kritéria pro statistickou významnost rozdílu hodnot v čase. Gen *rClock* byl rytmicky exprimován pouze v lačnicku. Podobně jako v SCN a jiných dříve studovaných periferních orgánech probíhá tedy i ve střevních buňkách exprese *rPer1*, *rPer2* a *rRev-erb-α* přibližně v opačné fázi než exprese *rBmal1*. Exprese *rPer2* je také vždy přibližně o 4 hodiny zpožděna vůči *rPer1*. Námi prokázaná přítomnost cirkadiánních hodin ve střevním epitelu byla potvrzena také v tlustém střevu laboratorní myši (Hoogerwerf *et al.* 2007). Stejně jako v játrech, lze i v tlustém střevu potkana díky změně doby krmení (restricted feeding) seřadit rytmus v expresi hodinových genů, a to nezávisle na SCN (Sládek *et al.* 2007). Cirkadiánní hodiny ve střevě jsou tak synchronizovány nejen signály z centrálních hodin v SCN, ale také signály souvisejícími s rytmem v příjmu potravy. Cirkadiánní hodiny ve střevním epitelu se podílí na řízení jeho fyziologických funkcí, protože pravděpodobně řídí rytmickou expresi elektroneutrálního  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  transportéru NHE3 v tlustém střevu potkana (Sládek *et al.* 2007). Promotor NHE3 obsahuje E-box sekvenci díky níž je jeho exprese přímo řízena heterodimerem CLOCK-BMAL1 (Rohman *et al.* 2005). V podmínkách

„restricted feeding“ nastává fázový posun rytmické exprese NHE3 stejně jako je tomu u hodinových genů (Sládek *et al.* 2007).

Při podrobném sledování fází rytmické exprese genů *rPer1*, *rPer2* a *rBmall* v jednotlivých částech střeva bylo zjištěno, že se tyto fáze vzájemně liší. Nárůst, případně pokles exprese hodinových genů vykazoval posun ve smyslu zpoždění v průběhu cranio-caudální osy střeva. Podobný fázový vztah v expresi hodinových genů mezi jednotlivými částmi střeva nebyl dosud prokázán. Je to zřejmě způsobeno tím, že studie, která se zabývala touto otázkou sledovala profily exprese v časových odstupech po 4 hodinách během 24-hodinového cyklu. Díky tomu nebyly zaznamenány významné rozdíly ve fázi exprese genů v různých částech střeva (Hoogerwerf *et al.* 2007). Podobně i v naší práci byly rozdíly ve fázi rytmické exprese hodinových genů mezi dvanáctníkem, lačníkem, kyčelníkem a tlustým střevem pouze naznačeny, pokud byly jednotlivé odběry zvířat prováděny ve 4-hodinových intervalech. Proto jsme přistoupili k detailní analýze profilů exprese při odběrech každou hodinu během 12 hodin cirkadiánního cyklu. Tento interval odpovídal době původní světlé části dne a po vypuštění zvířat do stálé tmy reprezentoval dobu subjektivního dne. Během této doby je exprese genů *rPer1* a *rPer2* na vzestupu, zatímco exprese *rBmall* klesá. Exprese *rRev-erb-a* je v tuto dobu přibližně ve svém maximu. Díky tomuto přístupu bylo možno velmi přesně odečíst, kdy exprese daného genu narůstá nebo klesá a tyto doby pak vzájemně porovnat pro jednotlivé části střeva. Zjistili jsme, že dvě vůči sobě nejvzdálenější části střeva, tj. dvanáctník a tlusté střevo, vykazovaly nejvíce významné vzájemné rozdíly ve fázi genové exprese. V dvanáctníku docházelo k nárůstu či poklesu genové exprese dříve než v tlustém střevu. Bylo tedy prokázáno, že cirkadiánní hodiny v horní části trávicí soustavy, reprezentované dvanáctníkem, jsou fázově předběhnuty vůči hodinám v dolní části, reprezentované tlustým střevem.

V další části diplomové práce bylo prokázáno, že hodinami kontrolovaný gen *rWeel* je také rytmicky exprimován v trávicím systému laboratorního potkana. Gen *Weel* kóduje kinázu zapojenou v regulaci cyklu buněčného dělení a jeho exprese je řízena hodinovými geny v játrech myši (Matsuo *et al.* 2003). V této práci bylo zjištěno, že exprese *rWeel* vykazuje cirkadiánní rytmus v epitelálních buňkách dvanáctníku i tlustém střevu laboratorního potkana. Již z 24-hodinových profilů exprese bylo patrné, že se fáze tohoto rytmu v obou částech střeva vzájemně liší. Tato domněnka byla potvrzena v následujícím experimentu, kdy byly opět jako v případě hodinových genů sledovány detailní 12-hodinové profily exprese *rWeel*. Stejně jako u hodinových genů

byla také rytmická exprese *rWeel* fázově předběhnuta v dvanáctníku vůči tlustému střevu. Tento výsledek tak nepřímou dokazuje, že exprese *Weel* je pod přímou cirkadiánní kontrolou nejen v játrech, ale také v buňkách střevního epitelu. Propojení cirkadiánních hodin a buněčné proliferace bylo také prokázáno při pokusech s myšimi *Per1* a *Per2* mutanty, u kterých docházelo k zkrácení cyklu buněčného dělení (Fu *et al.* 2002). Hodinové geny by se tedy kromě kontroly fyziologických funkcí mohly také podílet na časování buněčného cyklu v jednotlivých částech střeva.

## **5.2. Vývoj rytmické exprese hodinových genů v epitelu tlustého střeva potkana**

V druhé části diplomové práce byl sledován vývoj výše prokázané rytmické exprese hodinových genů v tlustém střevu laboratorního potkana. Bylo zjištěno, že k expresi všech sledovaných genů dochází již v prenatálním stádiu, tj. ve 20. embryonálním dnu. Tato exprese však ještě nevykazovala typické cirkadiánní profily. I když byly rozdíly mezi jednotlivými časovými body statisticky významně odlišné u exprese *rPer1*, *rPer2* a *rClock*, následná analýza odhalila, že to bylo následkem snížení hladiny mRNA vždy pouze v jenom z časových odběrů, a to v CT24. Exprese *rBmal1*, *rRev-erba* a *rCry1* se u embryí během dne významně nelišila. 2. den po narození byl prokázán rytmus v expresi pouze u *rPer2*. V případě *rCry1* byla statisticky odlišná opět pouze hodnota v CT24 a exprese *rPer1*, *rBmal1*, *rRev-erb-a* a *rClock* nevykazovala žádné změny během dne. Ještě 10. den po narození byl prokázán rytmus v expresi pouze u *rPer1*, zatímco exprese ostatních genů se významně neměnila. 20. den po narození již byly rytmicky exprimovány geny *rPer1*, *rPer2*, *rBmal1*, *rRev-erb-a*, zatímco exprese *rClock* a *rCry1* nevykazovala cirkadiánní rytmus. 30. den po narození byly geny *rBmal1* a *rRev-erb-a* exprimovány rytmicky s vysokou amplitudou. U ostatních sledovaných genů nebyl rytmus prokázán mnohdy pravděpodobně díky velkému rozptylu hodnot v některém z časových bodů.

Vývoj rytmické exprese hodinových genů v periferních orgánech probíhá pomaleji než u centrálního oscilátoru v SCN (Sládek *et al.* 2004, Sládek *et al.* 2007). V této práci bylo zjištěno, že molekulární mechanismus zodpovědný za generování cirkadiánních rytmů se v periferních hodinách tlustého střeva potkana vyvíjí postupně podobně jako v játrech (Sládek *et al.* 2007). Vzhledem k zjištěným odlišnostem se však

zdá být tkáňově specifický. V játrech potkana byla prokázána rytmická exprese *rRev-erb-α* již 20. den embryonálního vývoje, zatímco ve střevě byly rytmy v expresi hodinových genů v tomto vývojovém stádiu nepřesvědčivé. Během ontogeneze se v játrech postupně objevuje rytmus v expresi jednotlivých hodinových genů v období mezi 10. a 30. dnem po narození, zatímco ve střevě spíše až v období mezi 20. a 30. dnem po narození. Zdá se tedy, že vývoj rytmické exprese hodinových genů je v střevním epitelu za vývojem v játrech opožděn. Takové opoždění by mělo své opodstatnění ve fyziologické relevanci nutnosti funkčních cirkadiánních hodin ve střevu ve vývojovém období, kdy doba příjmu potravy je zcela závislá na matce a nemůže být novorozeným mládětem nijak ovlivněna. Zůstává ale otázkou, zda se skutečně jedná o opoždění vývoje rytmické regulace exprese nebo spíše o následek opoždění vývoje vzájemné synchronizace mezi jednotlivými buněčnými oscilátory ve střevním epitelu. Tuto otázku bude možno zodpovědět až po provedení následných experimentů, které umožní sledovat rytmickou expresi hodinových genů na úrovni jedné buňky.

Na rozdíl od SCN, ve kterých jsou hodinové geny od počátku rytmicky exprimovány se shodnou fází jako u dospělých jedinců (Sládek *et al.* 2004), v tlustém střevu je cirkadiánní rytmus s amplitudou a fází shodnou s dospělými jedinci přítomen až u 30-denních mláďat. *rBmal1* je zde rytmicky exprimován v protifázi k *rPer1* a *rRev-erb-α*, ne však vůči *rPer2*. Fáze rytmické exprese hodinových genů se během ontogeneze mění. Nejlépe je to patrné při srovnání rytmické exprese *rBmal1* a *rRev-erb-α* mezi 20. a 30. dnem po narození. Děje se tak pravděpodobně díky změně doby příjmu potravy. Do odstavu, tj. přibližně do 22. dne po narození, jsou mláďata krmena matkou převážně během světlé části dne, zatímco dospělí jedinci běžně přijímají potravu především v noci, kdy je pravidelný příjem potravy během noci řízen pomocí SCN. Doba příjmu potravy je tedy pravděpodobně dominantní synchronizátor cirkadiánních hodin v tlustém střevu stejně jako v játrech.

### 5.3. Význam získaných výsledků

Výsledky předkládané diplomové práce prokázaly existenci cirkadiánních hodin v buňkách střevního epitelu. Tyto hodiny se pravděpodobně podílí na řízení rytmických funkcí střeva. Dále bylo ukázáno, že se tyto hodiny pravděpodobně podílí na nastavení fáze cyklu buněčného dělení ve střevním epitelu. Všechny tyto výsledky tak ukazují

na významnou roli cirkadiánního systému v řízení fyziologických funkcí gastrointestinálního traktu. Pochopení fungování celého cirkadiánního systému je důležité pro léčbu poruch spojených s jeho oslabením. Jedná se např. o poruchy spánku, vnitřní desynchronizaci organismu v důsledku přeletu přes více časových pásem (jet lag) nebo nedostatečnou kontrolu cyklu buněčného dělení. Podle klinických studií oslabení cirkadiánního systému také zvyšuje pravděpodobnost výskytu nádorových onemocnění. Zvířata, kterým byl cíleně odstraněn jeden nebo více hodinových genů (knockout genu) vykazovala poruchy v chování a metabolismu zahrnující riziko vyššího výskytu rakoviny a metabolického syndromu (Turek *et al.* 2005). Lidé pracující ve směnném provozu jsou náchylnější k onemocněním trávicího systému a výskytu kolorektálního karcinomu. Narušení exprese hodinových genů bylo objeveno v biopsiích pacientů majících kolorektální karcinom (Scheving 2007). Poznatky ze studia cirkadiánního systému by mohly být v budoucnu použity pro studium lidského metabolismu a chorob spojených s jeho oslabením. Znamá data poukazují na úspěšnost léčby rakoviny pomocí 5-fluorouracilu (5-FU) v závislosti na čase podání chemoterapeutik se zaměřením na co největší toxický efekt na nádor a zároveň co nejmenší poškození pacienta (Wood *et al.* 2006). Rozvoj chronofarmakologie poskytuje naději na řešení těchto problémů.

## 6.SOUHRN

1. Při sledování profilů exprese hodinových genů v jednotlivých částech trávicího systému potkana (dvanáctník, lačník, kyčelník, tlusté střevo) bylo zjištěno:
  - a) Během 24 hodin byly geny *rPer1*, *rBmal1* a *r-Rev-erb-α* exprimovány rytmicky ve všech částech střeva. Rytmická exprese *rPer2* byla prokázána ve všech částech střeva kromě kyčelníku. *rClock* byl rytmicky exprimován pouze v lačníku. Expres *rPer1*, *rPer2* a *rRev-erb-α* probíhá přibližně v opačné fázi než exprese *rBmal1*. Profily jednotlivých hodinových genů mají podobný průběh ve všech částech střeva, jsou ale fázově posunuty.
  - b) Porovnáním fáze rytmické exprese jednotlivých genů byly prokázány rozdíly v nárůstu/poklesu hladin mRNA v jednotlivých částech střeva. Expres hodinových genů v dvanáctníku je významně fázově předběhnuta vůči tlustému střevu.
2. Pomocí metody imunocytochemie byly proteiny rPER1 a rBMAL1 lokalizovány jednotlivě v buňkách epitelu kolorektální části tlustého střeva. Oba proteiny vykazovaly nejvyšší imunopozitivitu během subjektivního dne.
3. Při sledování profilů exprese genu *rWeel* v dvanáctníku a tlustém střevu potkana bylo zjištěno:
  - a) Během 24 hodin byl gen *rWeel* exprimován rytmicky v dvanáctníku i tlustém střevu. Expres genu *rWeel* probíhá přibližně ve stejné fázi jako exprese *rPer1* a *rPer2*.
  - b) Porovnáním fáze rytmické exprese genu *rWeel* byly prokázány rozdíly v nárůstu/poklesu hladiny mRNA mezi dvanáctníkem a tlustým střevem. Expres genu v dvanáctníku je fázově předběhnuta oproti tlustému střevu podobně jako je tomu u exprese hodinových genů.
4. Při sledování vývoje exprese hodinových genů v tlustém střevu během ontogenetického vývoje potkana byl prokázán postupný vývoj rytmické exprese hodinových genů. Fáze rytmů v expresi hodinových genů v tlustém střevu



se během postnatálního období života mění, a to zřejmě v důsledku změny doby příjmu potravy.

## 7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Ali A.M., Boujard T., Gerkema M.P. (1992): Terminology in biological rhythms. ASI vol. Plen. 5-9.

Aschoff J. (1960): Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 25: 11-28.

Balsalobre A. (2002): *Clock* genes in mammalian peripheral tissues. Cell Tissue Res. 301 (1): 193-199.

Balsalobre A., Damiola F., Schibler U. (1998): A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. Cell 93 (6): 929-937.

Balsalobre A., Marcacci L., Schibler U. (2000): Multiple signaling pathways elicit circadian gene expression in cultured Rat-1 fibroblasts. Curr. Biol. 10 (20): 1291-1294.

Bjarnason G.A., Jordan R.C., Wood P.A., Li Q., Lincoln D.W., Sothorn R.B., Hrushesky W.J., Ben-David Y. (2001): Circadian expression of clock genes in human oral mucosa and skin: association with specific cell-cycle phases. Am. J. Pathol. 158 (5): 1793-801.

Brandstaetter R. (2004): Circadian lessons from peripheral clocks: is the time of the mammalian pacemaker up? Proc. Atl. Acad. Sci. USA 101 (15): 5339-5346.

Bubenik G.A., Pang S.F., Hacker R.R., Smith P.S. (1996): Melatonin concentrations in serum and tissues of porcine gastrointestinal tract and their relationship to the intake and passage of food. J. Pineal Res. 21: 251-256.

Buijs R.M., van Eden C.G., Goncharuk V.D., Kalsbeek A. (2003): The biological clock tunes the organs of the body: Timing by hormones and the autonomic nervous system. J. Endocrinol. 177 (1): 17-26.

Bunger M.K., Wilsbacher L.D., Moran S.M., Clendenin C., Radcliffe L.A., Hogenesch J.B., Simon M.C., Takahashi J.S., Bradfield C.A. (2000): *Mop3* is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. *Cell* 103 (7): 1009-1017.

Cermakain N., Sassone-Corsi P. (2002): Environmental stimulus perception and control of circadian clocks. *Curr. Opin. Neurobiol.* 12 (4): 359-365.

Chen D., Buchanan G.F., Ding J.M., Hannibal J., Gillette M.U. (1999): Pituitary adenylyl cyclase-activating peptide: a pivotal modulator of glutamatergic regulation of the suprachiasmatic circadian clock. *Proc. Natl. Sci. USA* 96 (23): 13468-13478.

Cheng H.Y., Papp J.W., Varlamova O., Dziema H., Russell B., Curfman J.P., Nakazawa T., Schimizu K., Okamura H., Impey S., Obrietan K. (2007): microRNA modulation of circadian-clock period and entrainment. *Neuron* 54 (5): 813-29.

Curtis A.M., Seo S., Westgate E.J., Rudic R.D., Smyth E.M., Chakravarti D., Fitzgerald G.A., McNamara P. (2004): Histone acetyltransferase-dependent chromatin remodeling and the vascular clock. *J. Biol. Chem.* 279: 7091-7097.

Damiola F., Le Minh N., Preitner N., Kornmann B., Fleury-Olela F., Schibler U. (2000): Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev.* 14 (23): 2950-2961.

DeBruyne J.P., Noton E., Lambert C.M., Maywood E.S., Weaver D.R., Reppert S.M. (2006): A clock shock: mouse CLOCK is not required for circadian oscillator function. *Neuron* 50 (3): 465-477.

Dunlap J.C. (1999): Molecular bases for circadian clock. *Cell* 96 (2): 271-290.

Dussault I., Fawcett D., Matthyssen A., Bader J.A., Giguere V. (1998): Orphan nuclear receptor ROR alpha-deficient mice display the cerebellar defects of staggerer. *Mech. Dev.* 70(1-2): 14753.

Ebisawa T., Uchiyama M., Kajimura N., Mishima K., Kamei Y., Katoh M., Watanabe T., Sekimoto M., Shibui K., Kim K., Kudo Y., Ozeki Y., Suqishita M., Toyoshima R., Inoue Y., Yamada N., Nagase T., Ozaki N., Ohara O., Ishida N., Okawa M., Takahashi K., Yamauchi T. (2001): Association of structural polymorphisms in the human *Period3* gene with delayed sleep phase syndrom. EMBO Rep. 2 (4): 342-346.

Eide E.J., Virshup D.M. (2001): *Casein kinase I*: another cog in the circadian clockworks. Chronobiol. Int. 18 (3): 389-398.

Etchegaray J.-P., Lee C., Wade P.A., Reppert S.M. (2003): Rhythmic histone acetylation underlies transcription in the mammalian circadian clock. Nature 421: 177-182.

Forman B.M., Chen J., Blumberg B., Kliewer S.A., Henshaw R., Ong E.S., Evans R.M. (1994): Cross-talk among ROR  $\alpha$ 1 and the Rev-erb family of orphan nuclear receptors. Mol. Endocrinol. 8 (9): 1253-61.

Fu L., Pelicano H., Liu J., Hang P., Lee C. (2002): The circadian gene *Period2* plays an important role in tumor suppression and DNA damage response *in vivo*. Cell 111 (1): 41-50.

Gachon F., Olela F.F., Schaad O., Descombes P., Schibler U. (2006): The circadian PAR-domain leucine zipper transcription factors DBP, TEF and HLF modulate basal and inducible xenobiotic detoxification. Cell Metab. 4 (1): 25-36.

Gekakis N., Staknis D., Nguyen H.B., Davis F.C., Wilsbacher L.D. (1998): Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. Science 280 (5369): 1564-1569.

Gery S., Komatsu N., Baldjyan L., Yu A., Koo D., Keaffer H.P. (2006): The circadian gene *Per1* plays an important role in cell growth and DNA damage control in human cancer cell. Mol. Cell 22 (3): 375-82.

Giguere V., Tini M., Flock G., Ong E., Evans R.M., Otulakowski G. (1994): Isoform-specific amino-terminal domains dictate DNA-binding properties of ROR alpha, a novel family of orphan hormone nuclear receptors. *Genes Dev.* 8: 538-553.

Gillette M.U., Tischkau S.A. (1999): Suprachiasmatic nucleus: the brain's circadian clock. *Recent Prog. Horm. Res.* 54: 33-58.

Gooley J.J., Schomer A., Saper C.B. (2006): The dorsomedial hypothalamic nucleus is critical for the expression of food-entrainable circadian rhythms. *Nat. Neurosci.* 9 (3): 398-407.

Hamada T., Yamanouchi S., Watanabe A., Shibata S., Watanabe S. (1999): Involvement of glutamate release in substance P-induced phase delays of suprachiasmatic neuron activity rhythms *in vitro*. *Brain Res.* 836 (1-2): 190-193.

Hara R., Wan K., Wakamatsu H., Aida R., Moriya T., Akiyama M., Shibata S. (2001): Restricted feeding entrains liver clock without participation of the suprachiasmatic nucleus. *Genes Cells* 6 (3): 269-278.

Harding H.P., Lazar M.A. (1993): The orphan receptor Rev-erbA alpha activates transcription via a novel response element. *Mol. Cell Biol.* 13(5): 3113-21.

Hastings M.H., Reddy A.B., Maywood E.S. (2003): A clockwork web: circadian timing in brain and periphery, in health and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 4 (8): 649-661.

Hida A., Koike N., Hirose M., Hattori M., Sakaki I., Tei H. (2000): The human and mouse *Period1* genes: five well-conserved E-boxes additively contribute to the enhancement of *mPer1* transcription. *Genomics* 65 (3): 224-233.

Hirayama J., Sahar S., Grimaldini B., Tamaru T., Takamatsu K., Nakahata Y., Sassone-Corsi P. (2007): CLOCK-mediated acetylation of BMAL1 controls circadian function. *Nature* 450 (7172): 1086-90.

Hirota T., Okano T., Kokame K., Shirotani-Ikejima H., Miyata T., Fukada Y. (2002): Glucose down-regulates *Per1* and *Per2* mRNA levels and induces circadian gene expression in cultured Rat-1 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 277 (46): 44244-51.

Hoogerwerf W.A., Hellmich H.L., Cornélissen G., Halberg F., Shahinian V.B., Bostwick J., Savidge T.C., Cassone V.M. (2007): *Clock* gene expression in the murine gastrointestinal tract: endogenous rhythmicity and effects of a feeding regimen. *Gastroenterology* 133 (4): 1250-60.

Huether G., Poegeller G., Reimer R., George A. (1992): Effect of tryptophan administration on circulating melatonin levels in chicks and rats: evidence for stimulation of melatonin synthesis and release in the gastrointestinal tract. *Life Sci.* 51: 945-953.

Illnerová H. (1995): Pokroky v neurovědách. kapitola Chronobiologie. Univerzita Karlova.

Illnerová H. (1996): Melatonin a jeho působení. *Vesmír* 75, 266.

Jetten A.M., Kurebayashi S., Ueda E. (2001): The ROR nuclear orphan receptor subfamily: critical regulators of multiple biological processes. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 69: 205-47.

Jin X., Shearman L.P., Weaver D.R., Zylka M.J., De Vries G.J., Reppert S.M. (1999): A molecular mechanism regulating rhythmic output from suprachiasmatic circadian clock. *Cell* 96 (1): 57-68.

Kalsbeek A., La Fleur S., Van Heijningen C., Buijs R.M. (2004): Suprachiasmatic GABAergic inputs to the paraventricular nucleus control plasma glucose concentrations in the rat via sympathetic innervation of the liver. *J. Neurosci.* 24 (35): 7604-7613.

Kalsbeek A., van der Vliet J., Buijs R.M. (1996): Decrease of endogenous vasopressin release necessary for expression of the circadian rise in plasma corticosteron: a reverse microdialysis study. *J. Neuroendocrinol.* 8: 229-307.

Kennaway D.J., Varcoe T.J., Mau V.J. (2003): Rhythmic expression of clock and clock-controlled genes in the rat oviduct. *Mol. Hum. Reprod.* 9 (9): 503-507.

King D.P., Zhao Y., Sangoram A.M., Wilsbacher L.D., Tahala M., Antoch M.P., Steeves T.D., Vitaterna M.H., Kornhauser J.M., Lowrey P.L., Turek F.W., Takahashi J.S. (1997): Positional cloning of the mouse circadian *Clock* gene. *Cell* 89 (4): 641-653.

Klein D.C. (2004): The 2004 Aschoff/Pittendrigh lecture: Theory of the origin of the pineal gland-a tale of conflict and resolution. *J. Biol. Rhythms* 19: 264-279.

Kornhauser J.M., Nelson D.E., Mayo K.E., Takahashi J.S. (1990): Photic and circadian regulation of *c-fos* gene expression in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Neuron* 5 (2): 127-134.

Kováčiková Z., Sládek M., Bendová Z., Illnerová H., Sumová A. (2006): Expression of clock and clock-driven genes in the rat suprachiasmatic nucleus during late fetal and early postnatal development. *J. Biol. Rhythms* 21 (2): 140-8.

Kume K., Zylka M.J., Sriram S., Shearman P., Weaver D.R., Jin X., Maywood E., Hastings M.H., Reppert S.M. (1999): mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell* 98 (2): 193-205.

Landry G.J., Simon M.M., Webb I.C., Mistlberger R.E. (2006): Persistence of a behavioral food-anticipatory circadian rhythm following dorzomedial hypothalamic ablation in rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 290 (6): R1527-34.

Le Minh N., Damiola F., Tronche F., Schütz G., Schibler U. (2001): Glucocorticoid hormones inhibit food-induced phase-shifting of peripheral circadian oscillators. *EMBO J.* 20 (24): 7128-7136.

Leak R.K., Card J.P., Moore R.Y. (1999): Suprachiasmatic pacemaker organization analyzed by viral transynaptic transport. *Brain Research* 819 (1-2): 23-32.

Leard L.E., Macdonald E.S., Heller H.C., Kilduff T.S. (1994): Ontogeny of photic-induced *c-fos* mRNA expression in rat suprachiasmatic nuclei. *Neuroreport*. 5 (18): 2683-7.

Lee C., Etchegaray J.P., Cagampang R.A., Loudon A.S., Reppert S.M. (2001): Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. *Cell* 107 (7): 855-867.

Liu C., Weaver D.R., Jin X., Shearman L.P., Pieschl R.L., Gribkoff V.K., Reppert S.M. (1997): Molecular dissection of two distinct actions of melatonin on the suprachiasmatic clock. *Neuron* 19 (1): 91-102.

Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser C.A., Krieger M., Scott M.P., Zipursky S.L., Darnell J. (2004): *Molecular Cell Biology*. W. H. Freeman and Company.

Lopez-Molina L., Conquet F., Dubois-Dauphin M, Schibler U. (1997): The *Dbp* gene is expressed according to a circadian rhythm in the suprachiasmatic nucleus and influences circadian behavior. *EMBO J*. 16: 6762-6771.

Lowrey P.L., Shimomura K., Antoch M.P., Yamazaki S., Zemenides P.D., Ralph M.R., Menaker M., Takahashi J.S. (2000): Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation *tau*. *Science* 288 (5465): 483-492.

Matsuo T., Yamaguchi S., Mitsui S., Emi A., Shimoda F., Okamura H. (2003): Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division *in vivo*. *Science* 302 (5643): 255-9.

Menaker M., Wiesner S. (1983): Temperature-compensated circadian clock in the pineal of *Anolis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (19): 6119-6121.

Mihai R., Juss T.S., Ingram C.D. (1994): Suppression of suprachiasmatic nucleus neurone activity with vasopressin receptor antagonist: possible role for endogenous vasopressin in circadian activity cycles *in vitro*. *Neurosci. Lett*. 179: 95-99.



Moore R.Y. (1991): Development of the suprachiasmatic nucleus in: Suprachiasmatic nucleus: The Mind's clock (Klein D.C., Moore R.J., Reppert S.M., Eds.). Oxford University Press, New York pp. 197-216.

Moore R.Y., Speh J.C. (1993): GABA is the principal neurotransmitter of the circadian timing system. *Neurosci. Lett.* 150 (1): 112-116.

Morin L.P., Blanchard J. (1995): Organization of the hamster intergeniculate leaflet: NPY and ENK projections to the suprachiasmatic nucleus, intergeniculate leaflet and posterior limitans nucleus. *Vis. Neurosci.* 12 (1): 57-67.

Ohta H., Honma S., Abe H., Honma K. (2002): Effects of nursing mothers on *rPer1* and *rPer2* circadian expressions in the neonatal rat suprachiasmatic nuclei vary with developmental stage. *Eur. J. Neurosci.* 15: 1953-1960.

Ohta H., Honma S., Abe H., Honma K. (2003): Periodic absence of nursing mothers phase-shifts circadian rhythms of clock genes in the suprachiasmatic nucleus of rat pups. *Eur. J. Neurosci.* 17: 1628-1634.

Oishi K., Fukui H., Ishida N. (2000): Rhythmic expression of *Bmal1* mRNA is altered in *Clock* mutant mice: differential regulation in the suprachiasmatic nucleus and peripheral tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 268 (1): 164-171.

Oishi K., Miyazaki K., Ishida N. (2002): Functional CLOCK is not involved in the entrainment of peripheral clocks to the restricted feeding: entrainable expression of *mPer2* and *mBmal1* mRNAs in the heart of *Clock* mutant mice on Jcl:ICR background. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 298 (2): 198-202.

Oishi K., Sakamoto K., Okada T., Nagase T., Ishida N. (1998): Humoral signals mediate the circadian expression of rat *period* homologue (*rPer2*) mRNA in peripheral tissues. *Neurosci. Lett.* 256 (2): 117-119.

Okamura H., Yamaguchi S., Yagita K. (2002): Molecular machinery of the circadian clock in mammals. *Cell Tissue Res.* 309 (1): 47-56.

Panda S., Antoch M.P., Miller B.H., Su A.I., Schook A.B., Straume M., Schultz P.G., Kay S.A., Takahashi J.S., Hogenesch J.B. (2002): Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell* 109: 307-320.

Panda S., Provencio I., Tu D.C., Pires S.S., Rollag M.D., Castrucci A.M., Pletcher M.T., Sato T.K., Wiltshire T., Andahazy M., Kay S.A., Van Gelder R.N., Hogenesch J.B. (2003): Melanopsin is required for non-image-forming photic response in blind mice. *Science* 301 (5632): 525-527.

Pardini L., Keaffer B., Trubuil A., Bourreille A., Galmiche J.P. (2005): Human intestinal circadian clock: expression of clock genes in colonocytes lining the crypt. *Chronobiol. Int.* 22 (6): 951-61.

Park H.T., Beak S.Y., Kim B.S., Kim J.B., Kim J.J. (1996): Developmental expression of 'RZR beta, a putative nuclear-melatonin receptor' mRNA in the suprachiasmatic nucleus of the rat. *Neurosci. Lett.* 217(1): 17-20.

Partch C.L., Shields K.F., Thompson C.L., Selby C.P., Sancar A. (2006): Posttranslational regulation of the mammalian circadian clock by cryptochrome and protein phosphatase 5. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103 (27): 10467-72.

Preitner N., Damiola F., Lopez-Molina L., Zakany J., Duboule D., Albrecht U., Schibler U. (2002): The orphan nuclear receptor REV-ERB $\alpha$  controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell* 110 (2): 251-260.

Raikhlin N.T., Kvetnoy I.M. (1976): Melatonin and enterochromaffin cells. *Acta Histochem.* 55: 19-24.

Ralph M.R., Menaker M. (1988): A mutation of the circadian system in golden hamsters. *Science* 241 (4870): 1225-1227.

Reick M., Garcia J.A., Dudley C., McKnight S.L. (2001): NPAS2: An analog of *Clock* operative in the mammalian forebrain. *Science* 293 (5529): 506-509.

Reppert S.M., Weaver D.R. (2001): Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annu. Rev. Physiol.* 63: 647-676.

Ripperger J.A., Shearman L.P., Reppert S.M., Schibler U. (2000): CLOCK, an essential pacemaker component, controls expression of the circadian transcription factor DBP. *Genes Dev.* 14 (6): 679-689.

Rohman M.S., Emoto M., Nonaka H., Okura R., Nishimura M., Yagita K., van der Horst G.T., Matsuo M., Okamura H., Yokoyama M. (2005): Circadian clock genes directly regulate expression of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE3 in the kidney. *Kidney Int.* 67 (4): 1410-9.

Rutter J., Reick M., McKnight S.L. (2002): Metabolism and the control circadian rhythms. *Annu. Rev. Biochem.* 71: 307-331.

Sakamoto K., Nagase T., Fukui H., Horikawa K., Okada T., Tanaka H., Sato K., Miyake Y., Ohara O., Kako K., Ishida N. (1998): Multitissue circadian expression of rat *period* homolog (*rPer2*) mRNA is governed by the mammalian circadian clock, the suprachiasmatic nucleus in the brain. *J. Biol. Chem.* 273 (42): 27039-27042.

Sakamoto K., Oishi K., Nagase T., Miyazaki K., Ishida N. (2002): Circadian expression of clock genes during ontogeny in the rat heart. *Neuroreport.* 13: 1239-1242.

Scheving L.A. (2000): Biological clocks and the digestive system. *Gastroenterology* 119 (2): 536-49.

Scheving L.E., Scheving L.A., Tsai T.H., Pauky J.E. (1984): Effect of fasting on circadian rhythmicity in deoxyribonucleic acid synthesis of several murine tissues. *J. Nutr.* 114 (11): 2160-6.

Scheving L.E., Tsai T.H., Scheving L.A. (1983): Chronobiology of the intestinal tract of the mouse. *Am. J. Anat.* 168 (4): 433-65.

Schibler U. (2003): Circadian rhythms: Liver regeneration clocks on. *Science* 302 (5643): 234-5.

Schibler U. (2005): The daily rhythms of genes, cells and organs. *EMBO Rep.* 6 Spec. no: S9-S13.

Schibler U. (2007): The daily timing of gene expression and physiology in mammals. *Dialogues Clin. Neurosci.* 9(3): 257-72.

Schibler U., Naef F. (2005): Cellular oscillators: rhythmic expression and metabolism. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17 (2): 223-229.

Schibler U., Ripperger J., Brown S.A. (2003): Peripheral circadian oscillators in mammals: time and food. *J. Biol. Rhythms* 18 (3): 250-260.

Siepkja J.M., Yoo S.M., Park J., Song W., Kumar V., Hu Y., Lee C., Takahashi J.S. (2007): Circadian mutant *Overtime* reveals F-box protein FBXL3 regulation of *cryptochrome* and *period* gene expression. *Cell* 129(5): 1011-23.

Silver R., Schwartz W.J. (2005): The suprachiasmatic nucleus is a functionally heterogenous timekeeping organ. *Methods enzymol.* 393: 451-465.

Shearman L.P., Sriram S., Weaver D.R., Maywood E.S., Chaves I. (2000): Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science* 288 (5465): 1013-1019.

Shibata S. (2004): Neural regulation of the hepatic circadian rhythm. *Anat. Rec. A. Discov. Mol. Cell Evol. Biol.* 280: 901-909.

Sládek M., Jindráková Z., Bendová Z., Sumová A. (2007): Postnatal ontogenesis of the circadian clock within the rat liver. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 292 (3): R1224-9.

Sládek M., Rybová M., Jindráková Z., Zemanová Z., Polidarová L., Mrnka L., O'Neill J., Pácha J., Sumová A. (2007): Insight into the circadian clock within rat colonic epithelial cells. *Gastroendocrinology* 133 (4): 1240-9.

Sládek M., Sumová A., Kováčiková Z., Bendová Z., Laurinová K., Illnerová H. (2004): Insight into molecular core clock mechanism of embryonic and early postnatal rat suprachiasmatic nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 6231-6236.

Stokkan K.A., Yamazaki S., Tei H., Sakaki Y., Menaker M. (2001): Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science* 291 (5503): 490-493.

Stratmann M., Schibler U. (2006): Properties, entrainment, and physiological functions of mammalian peripheral oscillators. *J. Biol. Rhythms*. 21 (6): 494-506.

Sumová A., Bendová Z., Sládek M., El-Hennamy R., Laurinová K., Jindráková Z., Illnerová H. (2006): Setting the biological time in central and peripheral clocks during ontogenesis. *FEBS lett.* 580 (12): 2836-42.

Sun Z.S., Albrecht U., Zhuchenko O., Bailey J., Eichele G., Lee C.C. (1997): RIGUI, a putative mammalian ortholog of the *Drosophila Period* gene. *Cell* 90: 1003-1011.

Takahashi J.S., DeCoursey P.J., Bauman L., Menaker M. (1984): Spectral sensitivity of a novel photoreceptive system mediating entrainment of mammalian circadian rhythms. *Nature* 308 (5955): 186-188.

Toh K.L., Jones C.R., He Y., Eide E.J., Hinz W.A., Virshup D.M., Ptacek L.J., Fu Y.H., (2001): An *hPer2* phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrom. *Science* 291 (5506): 1040-1043.

Torra I.P., Tsibulsky V., Delaunay F., Saladin R., Laudet V., Fruchart J.C., Kosykh V., Staels B. (2000): Circadian and glucocorticoid regulation of *Rev-erba* expression in liver. *Endocrinology* 141 (10): 3799-3806.

Triqueneaux G., Thenot S., Kakizawa T., Antoch M.P., Safi R., Takahashi J.S., Dalaunay F., Laudet V. (2004): The orphan receptor *Rev-erba* gene is a target of the circadian clock pacemaker. *J. Mol. Endocrinol.* 33: 585-608.

Turek F.W., Joshu C., Kohsaka A., Lin E., Ivanova G., McDearmon E., Laposky A., Losu-Olson S., Easton A., Jensen D.R., Eckel R.H., Takahashi J.S., Bass J. (2005): Obesity and metabolic syndrome in circadian *Clock* mutant mice. *Science* 308 (5724): 1043-5.

Uhl G.R., Reppert S.M. (1986): Suprachiasmatic nucleus vasopressin messenger RNA: circadian variation in normal and Brattleboro rats. *Science* 232: 390-393.

Vitaterna M.H., King D.P., Chang A.-M., Kornhauser J.M., Lowrey P.L., McDonald J.D., Dove W.F., Pinto L.H., Turek F.W., Takahashi J.S. (1994): Mutagenesis and mapping of a mouse gene, *Clock*, essential for circadian behavior. *Science* 264: 719-725.

Weaver D.R., Reppert S.M. (1995): Definition of the developmental transition from dopaminergic to photic regulation of *c-fos* gene expression in the rat suprachiasmatic nucleus. *Mol. Brain Res.* 33: 136-148.

Welsh D.K., Logothetis D.E., Meister M., Reppert S.M. (1995): Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron* 14 (4): 697-706.

Wisor J.P. (2002): Disorders of the circadian clock: etiology and possible therapeutic targets. *Curr. Drug Targ.- CNS & Neurological Disorders* 1: 555-566.

Wood P.A., Du-Quiton J., You S., Hrushesky W.J. (2006): Circadian clocks coordinates cancer cell cycle progression, thymidylate synthase, and 5-fluorouracil therapeutic index. *Mol. Cancer Ther.* 5 (8): 2023-33.

Yamaguchi S., Mitsui S., Miyake S., Yan L., Onishi H., Yagita K., Suzuki M., Shibata S., Kobayashi M., Okamura H. (2000a): The 5' upstream region of *mPer1* gene contains two promoters and is responsible for circadian oscillation. *Curr. Biol.* 10 (14): 873-876.

Yamaguchi S., Mitsui S., Yan L., Yagita K., Miyake S., Okamura H. (2000b): Role of DBP in the circadian oscillatory mechanism. *Mol. Cell Biol.* 20(13): 4773-81.

Yamamoto T., Nakahata Y., Soma H., Akashi M., Mamme T., Takumi T. (2004): Transcriptional oscillation of canonical clock genes in mouse peripheral tissues. *BMC Mol. Biol.* 5 (1): 18.

Yamazaki S., Numano R., Abe M., Hida A., Takahashi R., Ueda M., Block G.D., Sakaki Y., Menaker M., Tei H. (2000): Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science* 288 (5466): 682-685.

Yoo S.H., Yamazaki S., Lowrey P.L., Shimomura K., Ko C.H., Buhr E.D., Siepka S.M., Hong H.K., Oh W.J., Yoo O.J., Menaker M., Takahashi J. (2004): PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (15): 5699-5700.

Yu W., Ikeda M., Abe H., Honma S., Ebisawa T., Yamauchi T., Honma K., Nomura M. (1999): Characterization of three splice variants and genomic organization of the mouse *Bmal1* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 260 (3): 760-767.

Yu W., Nomura M., Ikeda M. (2002): Interactivating feedback loops within the mammalian clock: BMAL1 is negatively autoregulated and upregulated by CRY1, CRY2, and PER2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 290 (3): 933-941.

Zylka M.J., Shearman L.P., Weaver D.R., Reppert S.M. (1998): Three *Period* homologs in mammals: differential light response in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts outside of brain. *Neuron* 20 (6): 1103-1110.